



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Suscetibilidade genética ao cancro da tiroide: variantes genómicas nas vias de metabolismo da vitamina D**

**Isabel Maria Santos Carvalho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos  
Co-orientador: Doutora Catarina Inês Nunes Pires Gonçalves

**Covilhã, outubro de 2018**

# Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado não seria possível sem todo o apoio e incentivo que me foi dado. A conclusão deste trabalho concretizou-se com a ajuda de todos aqueles que estiveram envolvidos nele e colaboraram para a execução do mesmo, a todos agradeço com a maior gratidão e compaixão.

Ao Professor Doutor Manuel Lemos, por me ter aceite como sua aluna para a realização deste trabalho, e pelo fornecimento de todo o material e formação necessários à conclusão do mesmo.

À Doutora Catarina, pela sua orientação, pela transmissão de conhecimento e total disponibilidade para ajudar a solucionar as várias dúvidas e dificuldades que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus amigos (Adriana, Rosa e Telma) e ao meu namorado, que sempre estiveram disponíveis para me acompanhar nos momentos mais complicados.

Por último e não menos importante, tenho a certeza que sozinha isto não seria possível, por isso dirijo um agradecimento especial às minhas irmãs (Susana, Lucília e Maria) e tios, por serem o principal “ pilar ” do meu sucesso neste trabalho, bem como, todo o apoio incondicional, amizade e paciência demonstrada. A eles dedico esta dissertação de mestrado!

## Resumo

O cancro da tiroide (CT) é a neoplasia endócrina maligna mais frequente e é uma patologia complexa com uma etiologia desconhecida. Nas últimas décadas, a sua incidência tem vindo a aumentar drasticamente. A vitamina D (vit D) é uma hormona secosteróide que pode ser produzida na pele após a exposição solar ou adquirida através da alimentação. A vit D é conhecida principalmente pelo seu papel fulcral no metabolismo ósseo e do cálcio, mas também tem efeitos inibitórios no desenvolvimento e progressão de tumores e a sua deficiência tem sido associada a vários tipos de cancro, incluindo o CT. Os níveis séricos de Vit D dependem, em parte, da dieta e da exposição solar, mas fatores genéticos também estão envolvidos. Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP's) localizados dentro ou próximo de genes que codificam enzimas essenciais para a síntese (*DHCR7*-rs12785878), metabolismo (*CYP2R1*-rs2060793) e degradação (*CYP24A1*-rs6013897) da vit D foram associados a níveis séricos de vit D. O objetivo deste estudo foi determinar a associação entre esses SNP's na via de metabolismo da vit D e a suscetibilidade genética ao CT na população portuguesa.

Realizou-se um estudo caso-controlo para analisar a prevalência desses SNP's em 500 doentes com CT e 500 controlos, utilizando as técnicas de reação de polimerização em cadeia (PCR) e de restrição enzimática. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre doentes e controlos e analisados de acordo com a idade, sexo, tipo de tumor, tamanho do tumor e presença de metástases ganglionares ou à distância.

Foi observado um aumento da frequência do alelo mais raro do *DHCR7* em doentes quando comparados com os controlos, sob um modelo de hereditariedade aditivo (OR = 1,38; 95% CI: 1,15-1,65; p = 0,0004) e codominante (OR = 1,88; IC95%: 1,30-2,74; p = 0,0021). Não foi encontrada nenhuma associação para os polimorfismos no *CYP2R1* e no *CYP24A1*. Não se observou correlação dos SNP's com as características tumorais.

Este estudo sugere que os polimorfismos do *DHCR7* poderão estar associados a um aumento do risco de desenvolver CT, devido a um efeito desse gene nos níveis circulantes de vit D, e poderá contribuir para uma melhor compreensão da patogénese do CT.

## Palavras-chave

Cancro da tiroide, Vitamina D, Genética, Polimorfismos, Endocrinologia

# Abstract

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy and a complex disease with a largely unknown aetiology. In the last decades, its incidence has been increasing drastically. Vitamin D (Vit D) is a secosteroid hormone that can be produced in the skin after sun exposure or acquired through diet. Vit D is mostly known for its role in bone and calcium metabolism, however, it also has inhibitory effects on tumour development and progression and its deficiency has been associated with several types of cancer, including TC. Serum levels of Vit D partly depend on diet and sunlight exposure, but genetic factors are also involved. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) located within or near genes that encode crucial enzymes for the synthesis (*DHCR7*-rs12785878), metabolism (*CYP2R1*-rs2060793) and degradation (*CYP24A1*-rs6013897) of Vit D have been associated with serum levels of Vit D. The aim of this study was to determine the association between these SNP's in the Vit D pathway and the genetic susceptibility to TC in the Portuguese population.

A case-control study was carried out in 500 patients with TC and 500 controls, using polymerase chain reaction (PCR) and enzyme restriction technique. Allele and genotype frequencies were compared between patients and controls, and analysed according to age, gender, tumour type, tumour size, and presence of lymph node or distant metastases.

An increase in the frequency of the rarer allele of *DHCR7* was observed in patients when compared to controls, under additive (OR=1,38; 95%CI: 1,15-1,65;  $p=0,0004$ ) and codominant (OR=1,88; 95%CI: 1,30-2,74;  $p=0,0021$ ) inheritance models. No association was found for the *CYP2R1* and *CYP24A1* polymorphisms. There was no correlation of the SNP's with tumour characteristics.

Our findings suggest that *DHCR7* polymorphisms may be associated with an increased risk to develop TC due to an effect of this gene on circulating Vit D levels, and may contribute to a better understanding of the pathogenesis of TC.

## Keywords

Thyroid cancer, Vitamin D, Genetics, Polymorphisms, Endocrinology.

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
1. Introdução .....	1
1.1. Glândula tiroideia .....	1
1.2. Cancro da tiroide .....	3
1.2.1. Carcinoma papilar da tiroide .....	4
1.2.2. Carcinoma folicular da tiroide .....	4
1.2.3 Alterações genéticas .....	5
1.3. Vitamina D .....	7
1.3.1. Metabolismo e mecanismo de ação da vitamina D .....	7
1.3.2. Fatores que influenciam os níveis de vitamina D .....	9
1.3.3. A importância da vitamina D na saúde .....	11
1.3.4. Associação da vitamina D ao cancro da tiroide .....	12
1.3.5. Estudos genéticos de associação entre a vitamina D e o cancro da tiroide .....	15
1.4. Objetivo do estudo .....	16
2.1. População em estudo .....	17
2.2. Extração de ADN a partir de sangue humano .....	17
2.3. Quantificação de ADN .....	18
2.4. Reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	19
2.5. Digestão enzimática .....	20
2.6. Eletroforese .....	21
2.7. Sequenciação de ADN .....	22
2.8. Análise estatística .....	24
3. Resultados .....	25
3.1. Genotipagem .....	25
3.1.1. Polimorfismo <i>CYP2R1</i> -rs2060793 .....	25
3.1.2. Polimorfismo <i>DHCR7</i> -rs12785878 .....	26
3.1.3. Polimorfismo <i>CYP24A1</i> -rs6013897 .....	27
3.2. Análise estatística .....	28
4. Discussão e Conclusão .....	32
5. Bibliografia .....	36

# Lista de Figuras

Figura 1 - Glândula tiroideia e unidades funcionais da tiroide (foliculo) .....	1
Figura 2 - Síntese das hormonas tiroideias .....	2
Figura 3 - Fotoprodução, metabolismo e ação da vitamina D .....	8
Figura 4 - Genotipagem do polimorfismo <i>CYP2R1</i> -rs2060793 (G>A) .....	25
Figura 5 - Genotipagem do polimorfismo <i>DHCR7</i> -rs12785878 (T>G) .....	26
Figura 6 - Genotipagem do polimorfismo <i>CYP24A1</i> -rs6013897 (T>A) .....	27

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Oligonucleótidos e condições de PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes <i>DHCR7</i> , <i>CYP2R1</i> e <i>CYP24A1</i> .....	20
Tabela 2 - Polimorfismos em estudo, endonuclease aplicadas, genótipos esperados e peso molecular dos respectivos fragmentos gerados por restrição enzimática .....	21
Tabela 3 - Análise das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo <i>CYP2R1</i> -rs2060793 de acordo com as características clínicas .....	29
Tabela 4 - Análise das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo <i>DHCR7</i> -12785878 de acordo com as características clínicas .....	30
Tabela 5- Análise das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo <i>CYP24A1</i> -rs6013897 de acordo com as características clínicas .....	31

# Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIC</b>	Akaike Information Criterion (critério de informação de Akaike)
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATC</b>	Anaplastic thyroid carcinoma (carcinoma da tireoide anaplásico)
<b>BRAF</b>	Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1
<b>CT</b>	Carcinoma da tireoide
<b>DBP</b>	Vitamin D Binding Protein (proteína de ligação da vitamina D)
<b>ddNTP</b>	Dideoxynucleotides Triphosphates (didesoxinucleótidos trifosfatados)
<b>DO</b>	Optical density (densidade ótica)
<b>DTC</b>	Differentiated thyroid carcinoma (carcinoma diferenciado da tireoide)
<b>ECM1</b>	Extracellular matrix protein 1 (proteína de matriz extracelular-1)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etileno-diamino-tetra-acético)
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FGF-23</b>	Fibroblast growth factor 23 (fator de crescimento de fibroblastos 23)
<b>FOXE1</b>	Forkhead box E1
<b>FTC</b>	Follicular thyroid carcinoma (carcinoma folicular da tireoide)
<b>GWAS</b>	Genome Wide Association Study (estudo de associação genética)
<b>HRAS</b>	V-HA-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IPO</b>	Instituto Português de Oncologia
<b>KRAS</b>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MIFC</b>	Minimally invasive follicular carcinoma (carcinoma folicular minimamente invasivo)
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)
<b>NIS</b>	Sodium/iodide symporter (simportador sódio-iodo)
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
<b>OR</b>	Odds Ratio (razão de probabilidade)
<b>PAX8</b>	Paired box gene 8
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (reação de polimerização em cadeia)
<b>PDTC</b>	Poorly differentiated thyroid carcinoma (carcinoma da tireoide pouco diferenciado)
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<b>PTC</b>	Papillary thyroid carcinoma (carcinoma papilar da tireoide)
<b>PTH</b>	Parathyroid Hormone (hormona da paratiróide)
<b>RAF</b>	Rapid - accelerated fibrosarcoma
<b>RAS</b>	Rat sarcoma virus homolog



<b>RET</b>	Rearranged during transfection
<b>RXR</b>	Retinoic X Receptor alfa (receptor X retinóico alfa)
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato de sódio)
<b>SLOS</b>	Síndrome de Smith-Lemli-Optiz
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotido único)
<b>T<sub>3</sub></b>	Triiodotironina
<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TMPRSS4</b>	Protein serine transmembrane type 4 (protease serina transmembranar tipo 4)
<b>TPO</b>	Thyroid peroxidase (peroxidase da tiroide)
<b>TRH</b>	TSH-releasing hormone (hormona libertadora de TSH)
<b>TSH</b>	Thyroid-stimulating hormone (hormona estimulante da tiroide)
<b>TSHR</b>	TSH Receptor (recetor da TSH)
<b>U</b>	Unidades
<b>UVB</b>	Ultra Violeta B
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor (recetor da vitamina D)
<b>VDRE's</b>	Vitamin D Responsive Element (elemento de DNA responsivo à Vit D)
<b>Vit D</b>	Vitamina D
<b>WIFC</b>	Widely invasive follicular carcinoma (carcinoma folicular amplamente invasivo)

# 1.Introdução

## 1.1. Glândula tiroideia

A primeira glândula endócrina a desenvolver-se no embrião humano é a tiroide (1). A glândula tiroideia localiza-se na parte anterior da laringe e da traqueia (2). Esta é a maior glândula endócrina do corpo humano, tem uma cor avermelhada devido à riqueza de capilares sanguíneos e tem a forma de uma borboleta, pois possui dois lobos unidos por um istmo estreito (3, 4). Em indivíduos adultos o peso desta glândula varia entre 15 a 25 gramas, sendo mais pesada nas mulheres, dependendo também de outros fatores como a incorporação de iodo, gravidez e outras condições patológicas (2).

A glândula tiroideia divide-se em inúmeros pequenos lóbulos que são delimitados por finos septos que provêm da camada de tecido conjuntivo que a rodeia. Cada um desses lóbulos contém entre a 20 a 40 folículos de diferentes tamanhos (2). O folículo é a unidade funcional da tiroide cuja principal função é produzir hormonas tiroideias (1). Este é uma estrutura arredondada constituída por uma única camada de células epiteliais especializadas, designadas de células foliculares ou tireócitos, que delimitam um espaço nomeado de coloide, onde a glicoproteína tiroglobulina (Tg) é armazenada. Além das células foliculares, a tiroide é constituída por células parafoliculares ou células C, localizadas entre os folículos e que, apesar de pertencerem à glândula tiroideia, são de origem embrionária diferente (1, 2).

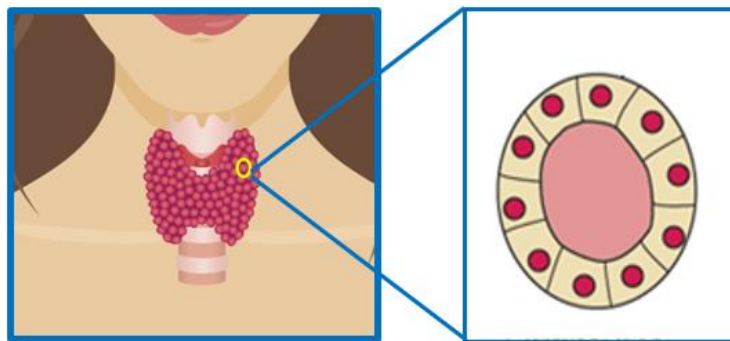
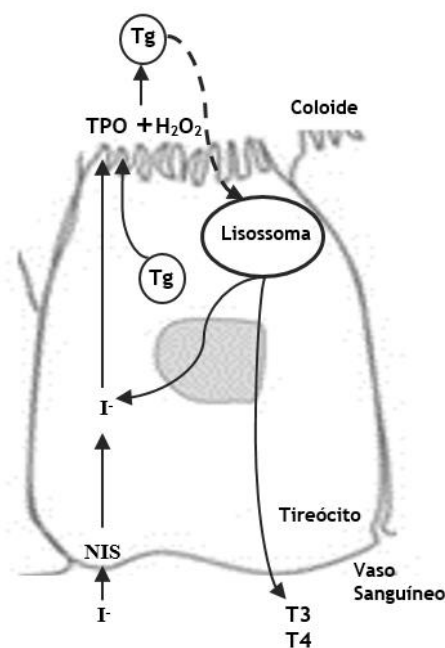


Figura 1. Glândula tiroideia e unidades funcionais da tiroide (folículo).

As células foliculares sintetizam as hormonas triiodotironina e tiroxina (T3 e T4), enquanto que as células parafoliculares sintetizam a calcitonina (5).

O eixo hipotálamo-hipófise exerce um papel fundamental no controlo da síntese das hormonas tiroideias, atuando sob um mecanismo de feedback negativo. A hormona libertadora de tirotropina (TRH) é segregada pelo hipotálamo e estimula a libertação da hormona estimuladora

da tiroide (TSH) pela hipófise anterior. A TSH liga-se a um recetor específico (TSHR) que se encontra na membrana das células foliculares que, por sua vez, estimula essas células a captarem o ião iodeto através de um transportador proteico (NIS: simportador sódio-iodo), a produzirem tiroglobulina, peroxidase da tiroide (TPO) e hormonas da tiroide. A proteína NIS transporta o ião iodeto para dentro das células foliculares, este é oxidado pela TPO e incorporado na tiroglobulina que é armazenada no coloide. Posteriormente, os resíduos de tiroglobulina monoiodados e diiodados são acoplados enzimaticamente de modo a formarem T3 (contendo 3 átomos de iodo) e T4 (contendo 4 átomos de iodo) (1, 6). Estas hormonas são libertadas para a corrente sanguínea, sendo transportadas por proteínas específicas, em que apenas uma pequena percentagem está livre e exerce a sua ação nos tecidos-alvo (7).



**Figura 2. Síntese das hormonas tiroideas.** O iodo entra na célula folicular através do simportador sódio-iodo (NIS), que se localiza na membrana do tireócito. O iodo e tiroglobulina (Tg) deslocam-se até à peroxidase da tiroide (TPO), que na presença de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) irá iodar a proteína Tg. A Tg é armazenada no coloide, que posteriormente entra na célula folicular por endocitose e desloca-se para o lisossoma, onde ocorrem as reações necessárias para a síntese de T3 e T4. Estas hormonas tiroideas são enviadas para a corrente sanguínea, onde são transportadas por proteínas específicas até aos seus tecidos alvo.

As hormonas tiroideas exercem um papel fulcral em muitos processos biológicos, como no desenvolvimento, no crescimento e no metabolismo (7). Nas disfunções da tiroide, tais como hipotireoidismo e hipertireoidismo, a ação das hormonas tiroideas fica comprometida, o que consequentemente irá desequilibrar a homeostase do organismo (2, 5, 6, 8). Os nódulos tiroideus são bastante comuns, podendo ser detetados em 65% da população geral. Cerca de 10% dos nódulos podem ser de origem maligna, no entanto a maioria é de origem benigna e são definidos como discretas lesões dentro da glândula da tiroide, ecograficamente diferentes do parênquima tiroideu circundante (9, 10).

Podem ser observados na glândula tiroideia tumores benignos (adenomas) ou tumores malignos (carcinomas) (8).

## 1.2. Cancro da tiroide

O cancro da tiroide (CT) é o cancro endócrino mais frequente, representando cerca de 96% de todas as neoplasias endócrinas (9). Nas últimas décadas, a sua incidência tem vindo a aumentar drasticamente. O aumento da incidência na população em geral deve-se essencialmente a uma melhoria dos testes de diagnóstico e à deteção precoce de pequenos microcarcinomas com menos de 1 cm de diâmetro. Em contrapartida, a taxa de mortalidade destas neoplasias endócrinas tem vindo a diminuir constantemente em várias regiões do mundo, devendo-se possivelmente à melhoria de diagnóstico e tratamento. No entanto, na América Central, Ásia, Europa Central e Oriental as taxas de mortalidade são consideravelmente altas, enquanto que na Europa Ocidental e América do Norte as taxas de mortalidade são mais baixas (9, 11-13).

Nos tumores malignos encaixam-se os Carcinomas Diferenciados de Tiroide (DTC) que são responsáveis por mais de 90% de todos os casos de carcinoma de tiroide. O carcinoma papilar da tiroide (PTC) e o Carcinoma Folicular da tiroide (FTC) têm origem nas células foliculares e fazem parte do grupo dos carcinomas diferenciados de tiroide. O CT pode ainda ser classificado de acordo com critérios clínicos e histológicos em Carcinoma Pouco Diferenciado (PDTC), Carcinoma Indiferenciado ou Anaplásico (ATC) e ainda o Carcinoma Medular que tem origem nas células parafoliculares. O prognóstico para os doentes com DTC é bastante bom, tendo uma taxa de sobrevivência de 90% e as metástases à distância ocorrem raramente, aparecendo em menos de 10% dos doentes com doença clínica e persistente (9, 14, 15).

A etiologia do cancro de tiroide mantém-se desconhecida, no entanto foram identificados vários fatores de risco (16). A exposição a radiação, especialmente na infância, e a baixa ingestão de iodo são fatores ambientais bastante discutidos em diversos estudos. Enquanto que as principais predisposições constitucionais internas são: a idade, pois a incidência aumenta com a idade, sendo mais frequente após os 30 anos e significativamente mais agressivo em idosos; o género, visto que a incidência é duas a três vezes maior nas mulheres, havendo a sugestão de que fatores hormonais possam estar envolvidos, existindo também alguns estudos que sugerem que as mudanças biológicas que ocorrem durante a gravidez podem aumentar o risco de carcinoma da tiroide; a obesidade é outro fator de risco, detetado através de numerosos estudos caso-controlo, no entanto, ainda não se conhece o mecanismo fisiopatológico; por último, as disfunções prévias na tiroide parecem ter grande impacto, tais como, as doenças autoimunes (Doença de Graves e Hashimoto). Para além dos fatores de risco anteriormente enumerados, a história familiar e as alterações genéticas herdadas poderão ser fortes causas para o desenvolvimento de neoplasias da tiroide (13, 17, 18).

O procedimento terapêutico habitual para os doentes que sofrem de carcinoma diferenciado de tireoide são a cirurgia e a terapêutica com radioiodo, seguidas da terapêutica substitutiva com levotiroxina (19).

### 1.2.1. Carcinoma papilar da tireoide

O carcinoma papilar da tireoide (PTC) é a forma mais comum do carcinoma diferenciado da tireoide e representa 80-85% de todas as neoplasias malignas da glândula tireoide (20). Histologicamente, o PTC deriva de células foliculares e apresenta sinais nucleares característicos, existindo vários subtipos histológicos que são nomeados de acordo com o seu componente estrutural dominante. Desses subtipos histológicos, o PTC clássico e a variante folicular são os mais frequentes, em que o PTC clássico é formado por estruturas papilares e é encontrado mais frequentemente em adultos e a variante folicular possui características foliculares e, por outro lado, características nucleares específicas de PTC (18, 19, 21). A maioria dos PTCs diagnosticados têm um diâmetro menor ou igual a um centímetro (microcarcinomas papilares). Estes tumores, na sua generalidade, têm um crescimento lento e bom prognóstico (22, 23).

O carcinoma papilar da tireoide tem geralmente um bom prognóstico, no entanto este piora quando ocorrem metástases, sendo que este tipo de neoplasia tem tendência a metastizar através dos vasos linfáticos para os gânglios linfáticos locais (9, 20).

### 1.2.2. Carcinoma folicular da tireoide

O carcinoma folicular da tireoide (FTC) deriva das células foliculares e representa 10-15% de todas as neoplasias malignas da tireoide. O FTC não possui as características nucleares específicas do PTC. Este carcinoma pode ser classificado como minimamente invasivo (MIFC) ou amplamente invasivo (WIFC). O MIFC é um tumor menos agressivo que se apresenta em doentes mais jovens, em que a proliferação neoplásica encontra-se encapsulada, no entanto, assim que a invasão vascular se torna extensa, o prognóstico piora. O WIFC é um carcinoma folicular mais agressivo que ocorre mais frequentemente em doentes mais idosos e manifesta invasão transcapsular, presença de metástases no momento do diagnóstico e altas taxas de reincidência. Para além destes, o carcinoma folicular oncocítico é uma forma especial de FTC que apresenta algumas diferenças em relação ao FTC convencional, uma dessas é a acumulação de elevado número de mitocôndrias (9, 19, 24).

O carcinoma folicular tem tendência a metastizar a longas distâncias, ao contrário do PTC, podendo produzir metástases pulmonares ou ósseas após a disseminação hematogénica (9).

### 1.2.3 Alterações genéticas

A análise molecular dos carcinomas de tireoide tem revelado inúmeras alterações genéticas envolvidas na sua formação e desenvolvimento. A compreensão dos mecanismos moleculares é essencial para diagnósticos precisos e tratamentos personalizados. Os genes envolvidos na reparação do ADN, na transdução de sinal e no controlo do ciclo celular são os que apresentam mais mutações genéticas (18, 25).

Nos últimos anos, uma grande diversidade de alterações genéticas, tais como mutações e polimorfismos de nucleótido único (SNP's) foram identificadas e associadas ao risco de CT. As mutações mais frequentes são as mutações pontuais dos genes *BRAF*, *RAS*, rearranjos PAX8/PPARy e rearranjos RET/PTC (18).

O proto-oncogene *BRAF* codifica uma quinase serina/treonina que pertence à família das proteínas RAF. A proteína BRAF desempenha um papel fundamental na regulação da via de sinalização MAPK que é uma via de transdução de sinal que utiliza uma série de proteínas quinases de forma a transmitir sinais da membrana celular para o núcleo. Esta via controla uma enorme variedade de processos celulares, como a proliferação, diferenciação, mobilidade e apoptose (18, 20). No gene *BRAF* podem existir diversas mutações, em que a mais prevalente é a *BRAF* c.1799 T>A (presente no exão 15). Esta é responsável pela substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600 (*BRAF* p.V600E) (18, 26). *BRAF* p.V600E é uma mutação pontual que tem sido associada à elevada ingestão de iodo, este mineral pode ser um fator de risco para a incidência de *BRAF* p.V600E (27, 28) ocorrendo predominantemente no carcinoma papilar da tireoide, encontrando-se presente em 36-83% dos casos de PTC (19, 26).

Em estudos anteriormente realizados, concluiu-se que estas mutações tendem a ocorrer em doentes mais idosos, estão significativamente relacionadas com o aumento de mortalidade em indivíduos com PTC, foram associadas a características clínico-patológicas agressivas (invasão extratireoideia, metástases e estágio avançado do tumor), assim como ao insucesso do tratamento com radioiodo e alta recidiva tumoral, mesmo num estágio baixo da patologia (18, 26, 28).

As proteínas da família RAS são pequenas GTPases que propagam sinais moleculares de forma a ativarem a via MAPK e outras vias de sinalização celular. As mutações RAS levam à ativação constitutiva das proteínas RAS e estão entre as alterações genéticas mais frequentes observadas em tumores da tireoide (18, 26). Os genes RAS, constituídos por 3 famílias (*NRAS*, *HRAS* e *KRAS*), encontraram-se mutados em tumores da tireoide benignos (adenomas foliculares) e malignos (FTC, variante folicular do PTC, PDTC e ATC). Estudos anteriores sugerem que os adenomas foliculares que abarquem mutações RAS podem ser vistos como lesões benignas precursoras da tumorigénese da tireoide, podendo estas mutações funcionar como um indicador de prognóstico de lesões foliculares (como o FTC e a variante folicular do PTC). As mutações RAS, que afetam

mais frequentemente o gene *N-RAS*, estão relacionadas com metástases à distância e/ou uma sobrevivência inferior em FTC. As mutações *RAS* ocorrem também frequentemente em PDTC e ATC e têm sido associadas a um pior prognóstico, a metástases à distância, a uma maior malignidade e uma menor sobrevivência global em carcinomas de tireoide pouco diferenciados. Em ATC, para além das mutações *RAS*, também se acumulam mutações adicionais, tais como, as do gene *TP53* que conferem uma maior agressividade (18, 20, 26).

O rearranjo *PAX8/PPAR $\gamma$*  ocorre através de uma translocação cromossômica t (2;3) (q13;p25) que resulta na fusão entre o gene *PAX8*, que codifica um fator de transcrição da tireoide, com o gene *PPAR $\gamma$*  (Recetor gama 1 de peroxissoma proliferador ativado), que codifica um recetor nuclear (18, 20). Os rearranjos *PAX8/PPAR $\gamma$*  são mais frequentes no FTC, estão presentes em 30-40% dos casos de FTC, podem também ser detetados em 2-13% dos adenomas foliculares e em baixa frequência, 1-5%, na variante folicular do PTC (18). Estudos indicam que estes rearranjos raramente evoluem para formas menos diferenciadas (ou seja, a sua prevalência é muito baixa em PDTC e ATC), no entanto, têm sido associados com algumas características de prognóstico adverso (como a multifocalidade e invasão vascular) (26).

Na oncogénese dos carcinomas medulares e papilares da tireoide, observou-se a envolvimento do proto-oncogene *RET* através da ativação de tirosinas quinases por mutações pontuais ou rearranjos. Os rearranjos *RET/PTC* são mais frequentes nos carcinomas papilares da tireoide e já foram descritos pelo menos 30 tipos de rearranjos *RET/PTC*, sendo o *RET/PTC1* e o *RET/PTC3* os rearranjos mais frequentes (9, 18). Os rearranjos *RET/PTC* resultam da fusão do domínio *RET* da tirosina quinase com a região 5'-terminal de genes heterólogos e essa fusão ocorre pois houve antecipadamente uma rutura do ADN que tem sido muito associada à exposição à radiação (18, 20, 26). Os rearranjos *RET/PTC* são mais frequentes em crianças e jovens adultos, não estão associados com o risco de recidiva e sabe-se muito pouco sobre as características clínicas e patológicas dos tumores que apresentam estes rearranjos (18).

Para além das mutações enunciadas, alguns polimorfismos de nucleótido único também estão associados ao risco do CT. Estudos de associação genómica (GWAS) identificaram algumas regiões cromossômicas envolvidas na suscetibilidade ao CT, essas regiões estão localizadas em 9q22.33, 14q13.3 e 8p12. Estes locais polimórficos podem influenciar a regulação e atividade génica, no entanto o mecanismo de ação dos SNP's ainda não é totalmente conhecido (18).

Até aos dias de hoje, realizaram-se diversos estudos para investigar o papel dos polimorfismos do gene *FOXE1* (Forkhead box E1) na suscetibilidade ao CT. O gene *FOXE1* localiza-se no cromossoma 9q22.33 e é constituído por um único exão que codifica o fator de transcrição *FOXE1* (ou TTF-2), que desempenha um papel muito importante na morfogénese da tireoide (18, 29). Este fator de transcrição regula a expressão da peroxidase da tireoide e da tiroglobulina. No gene *FOXE1* já foram descobertos diversos SNP's correlacionados com a malignidade da tireoide. As variações rs1867277 e rs71369530 têm sido muito estudadas e associadas ao risco de

CT em vários grupos étnicos (18, 30, 31). Este gene contém uma sequência de polialaninas polimórfica (rs71369530) que contém entre 11 a 22 resíduos, embora *FOXE1* 14Ala e *FOXE1* 16Ala representem as isoformas mais frequentes (18). A função destas sequências repetitivas é desconhecida, mas sabe-se que quando se encontram em genes codificantes de fatores de transcrição podem induzir perda ou ganho de funções (32). O SNP rs1867277 ocorre devido à transição A/G na região 5'-UTR do gene *FOXE1*, sendo que recentemente foi demonstrado que esta variante afeta a transcrição da *FOXE1*, pois na presença do alelo A deste SNP, a atividade transcricional do promotor do gene *FOXE1* aumenta (18).

O gene *XRCC1* codifica uma proteína que está envolvida na reparação de fraturas na cadeia de ADN causadas por radiação ionizante ou por alquilação. No gene *XRCC1* foram identificados inúmeros SNP's, em que Arg194Trp no exão 6 (rs1799782, C/T), Arg280His no exão 9 (rs25489, G/A) e Arg399Gln no exão 10 (rs25387, G/A) foram os três polimorfismos mais investigados. Na última década, vários estudos epidemiológicos descreveram a associação entre os polimorfismos do gene *XRCC1* e o risco de CT. Através desses estudos, observou-se que os genótipos Arg194Trp e Arg280His aumentavam o risco de desenvolvimento de DTC, enquanto que o polimorfismo Arg399Gln reduzia ligeiramente esse risco (18, 33).

Para além das regiões polimórficas anteriormente citadas, a região 8q24, a região 14q13 e a região do gene *RET* também estão relacionadas com a suscetibilidade ao CT (18).

## 1.3. Vitamina D

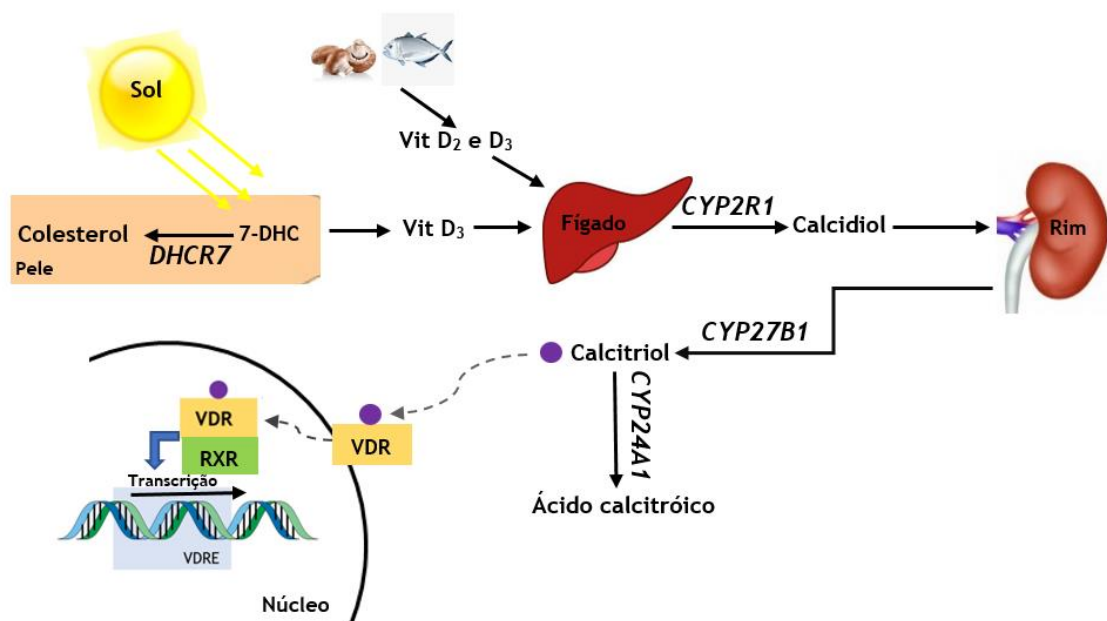
### 1.3.1. Metabolismo e mecanismo de ação da vitamina D

A vitamina D (vit D) é uma hormona secosteróide que pode ser produzida na pele após a exposição solar ou adquirida através da alimentação (34, 35). A vitamina D proveniente de origem vegetal designa-se de vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) estando presente, por exemplo, nos cogumelos. Por outro lado, a que provém de origem animal apresenta o nome de vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol), encontrando-se em maior quantidade nos peixes gordos, óleos de peixes e ovos (36-38). Importante referir que ambas as vitaminas enunciadas são ingeridas na alimentação e absorvidas pelo intestino, no entanto, esta via fornece pouca vitamina D ao organismo. Neste sentido, a principal fonte de vitamina D é obtida pela síntese endógena na pele. Este processo ocorre após a radiação ultravioleta B (UVB) (280-320nm) entrar em contacto com os queratinócitos, mais precisamente com o composto 7-desidrocolesterol (provitamina D), induzindo a fotoconversão do mesmo em pré-vitamina D, que posteriormente se transforma em vitamina D<sub>3</sub> por isomerização, permanecendo ainda inativa (35, 36, 38, 39).

A vitamina D (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) que provém de fontes endógenas e exógenas, é libertada para a corrente sanguínea e, como esta vitamina é lipossolúvel, necessita de ser transportada por uma proteína, sendo a proteína transportadora de vitamina D (DBP) a que possui mais afinidade para se



complexar com a vit D (38, 40). Estudos anteriores consideram o tecido adiposo um local de armazenamento da vit D que se encontra em excesso na corrente sanguínea, uma vez que foram detetados níveis de vit D 12 vezes mais elevados no tecido adiposo do que no soro (35). A vit D necessita de duas hidroxilações a fim de assumir uma forma biologicamente ativa. A primeira hidroxilação, catalisada pela enzima CYP2R1, decorre no fígado no carbono 25 (C-25) da vit D resultando na formação da 25 (OH) D<sub>3</sub> (calcidiol). 25 (OH) D<sub>3</sub> está presente na corrente sanguínea em maior quantidade e apresenta uma meia-vida de sensivelmente 25 horas, por esse motivo funciona como biomarcador de avaliação do estado nutricional da vit D. Após a sua síntese no fígado, o calcidiol é transportado pela DBP que o encaminha para diversos tecidos alvo, sendo o rim o mais conhecido. No túbulo renal proximal e noutros tecidos, 25 (OH) D<sub>3</sub> é hidroxilada no carbono 1 (C-1) pela enzima CYP27B1 transformando-se em 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (calcitriol). O calcitriol é a forma biologicamente ativa da vit D, isto é, a forma responsável por desencadear as ações biológicas da vit D (34-36, 38).



**Figura 3-Fotoprodução, metabolismo e ação da vitamina D.** A vitamina D provém através da produção endógena na pele ou através da alimentação. A de produção endógena nomeia-se de vit D<sub>3</sub> (colecalfiferol) que é sintetizada quando as radiações UVB do sol entram em contacto com a pele e transformam o composto 7-DHC em vit D<sub>3</sub>. O composto 7-DHC por outro lado também pode ser convertido pela DHCR7 em colesterol. Através da alimentação poderão provir a vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) e vitamina D<sub>3</sub>. Ambas as vitaminas irão ser transportadas pela proteína transportadora da vit D (DBP) até ao fígado, onde são convertidas pela enzima CYP2R1 em calcidiol. Posteriormente este composto é transportado até ao rim, onde pela enzima CYP27B1, irá ser transformado em calcitriol (forma biologicamente ativa da vit D). O calcitriol irá desempenhar a sua função nas suas células-alvo. Nestas células, assim que o calcitriol entra nas mesmas é reconhecido pelo recetor nuclear da vitamina D (VDR). Após a união do calcitriol ao VDR, este heterodimeriza-se com o recetor X retinóico alfa (RXR) e com moléculas co-reguladoras. O complexo formado irá ligar-se a elementos específicos de ADN responsivos à vit D, os VDRE's, modelando assim a transcrição de vários genes. Após a sua ação biológica o calcitriol irá ser catabolizado pela enzima CYP24A1 em ácido calcitróico, que posteriormente será excretado através da bílis e urina.

A atividade biológica do calcitriol é mediada pela ligação ao recetor de vitamina D (VDR), um membro da família de recetores esteroides que se encontra presente em diversos tipos de

células (35, 38). Para tal, é fundamental que o calcitriol chegue ao interior das células alvo onde será reconhecido pelo recetor nuclear VDR. Assim que o calcitriol chega ao citosol das células, liga-se ao VDR e induz uma alteração conformacional que facilita a heterodimerização com o recetor X retinóico alfa (RXR). O complexo formado dirige-se para o núcleo, mais especificamente para o ADN, onde se vai ligar a elementos específicos de ADN responsivos à vit D, designados de VDRE's. É através deste mecanismo que a vit D exerce o seu efeito genómico, isto é, a regulação da transcrição dos seus genes alvo, inibindo ou ativando a transcrição dos mesmos. Por fim, esse efeito é alcançado após o recrutamento de moléculas co-reguladoras e a restante maquinaria de transcrição (34, 35, 38). Após a vit D exercer a sua função biológica (a regulação de centenas de genes) será catabolizada pela enzima CYP24A1, presente no rim, em ácido calcitróico. Este é um metabolito biologicamente menos ativo que posteriormente é excretado através da biliar e da urina (36, 38).

### 1.3.2. Fatores que influenciam os níveis de vitamina D

Uma grande percentagem da população mundial possui deficiência de vitamina D, principalmente no médio Oriente, China, Mongólia e Índia. Os indivíduos idosos, as mulheres grávidas e os imigrantes não ocidentais são considerados os grupos de risco para deficiência da vitamina D sérica. A deficiência de vitamina D é definida dessa forma quando se encontra em níveis inferiores a 10 ng/mL (25 nmol/L), a insuficiência quando a vit D está entre 10 a 20 ng/mL (25-50 nmol/L) e a suficiência quando a vit D é superior a 20 ng/mL (>50 nmol/L). Posto isto, estima-se que menos de 50% da população mundial, no inverno, apresenta níveis de vit D séricos, mais especificamente 25(OH)D, acima de 50 nmol/L. A obtenção da vit D através da alimentação é reduzida, quando comparada com a quantidade de vit D que é produzida por fotoprodução (80%), portanto os níveis séricos de 25(OH)D são mais baixos no final do inverno e no início da primavera (41, 42).

A principal fonte de vit D é a fotoprodução, logo fatores que modifiquem a quantidade de radiações UVB incidentes na pele, afetam diretamente a taxa biossintética de vit D. Deste modo, a latitude, a poluição atmosférica, a hora do dia e a estação do ano são fatores que variam a quantidade de radiação ultravioleta disponível (41, 43). O tempo de exposição à luz solar, que não deve ser excessiva devido ao aumento do risco de cancro de pele, é crucial para a produção de vitamina D. Os idosos, por norma, possuem níveis de vit D baixos, devido à diminuição do número de queratinócitos, que consequentemente torna a síntese dérmica de vit D menos eficiente, essa diminuição deve-se também à redução da mobilidade que dificulta a saída da sua residência. Além da idade, a quantidade de melanina é inversamente proporcional à taxa de produção pela pele, pois quanto mais escura for a pele menor será a absorção da luz UVB (41, 44, 45). Por outro lado, o uso exagerado de protetores solares e cosméticos com proteção UVB prejudicam a biossíntese de vit D (41, 46).

Devido às diversas causas de baixos valores de vit D, a suplementação é recomendada em muitos países, especialmente no inverno. Essa suplementação para adultos pode variar entre os 15 a 25 µg (600-1000 UI) por dia (47).

Existem fatores genéticos que podem interferir com a via de metabolismo da vit D e com os seus níveis séricos. Por exemplo, mutações no gene *CYP2R1* são responsáveis por uma forma atípica de raquitismo por deficiência de vit D, em que a patologia se classifica de raquitismo dependente de vitamina D tipo 1B (48, 49). A síndrome de Smith-Lemli-Optiz (SLOS) é provocado por mutações no gene *DHCR7*, que codifica a proteína redutase do 7-desidrocolesterol (7-DHC). Essas mutações provocam uma deficiência na síntese da enzima que converte o 7-DHC em colesterol, que provoca uma acumulação de 7-DHC e uma diminuição da produção de colesterol. O SLOS é caracterizado por anomalias congénitas e atraso mental e é herdado através de um padrão autossômico recessivo (50, 51). O gene *CYP24A1* também é atingido por mutações, alterando a atividade da enzima codificada pelo mesmo. Estas mutações podem conduzir à hipercalcemia idiopática infantil, que resulta de uma diminuição do catabolismo do calcitriol (52, 53).

Para além das mutações anteriormente descritas, vários polimorfismos genéticos estão relacionados com os níveis da vitamina D, e estes poderão ser úteis para uma melhor compreensão da fisiologia das doenças associadas à vitamina D. Apesar de o mecanismo genético de como os polimorfismos atuam na concentração sérica de 25 (OH) ainda permanecer pouco conhecido, alguns estudos realizados com gémeos revelaram que os fatores genéticos podem explicar cerca de 50% da variação de 25(OH)D sérica (45, 54). Tais estudos sugerem que parte da variabilidade dos níveis de vit D se deve a fatores genéticos hereditários, isto é, genótipos diferentes alteram os níveis de vit D. Wang et al. (55) observaram que cerca de 1-4% da variabilidade dos níveis de vit D pode ser explicada pela presença de SNP's nos genes *DHCR7*, *GC* e *CYP2R1*, responsáveis respetivamente pela síntese, transporte e metabolismo da vit D. Este estudo foi realizado em 33 996 indivíduos de descendência europeia, e concluiu que os polimorfismos *DHCR7*-rs12785878 e *CYP2R1*-rs2060793 estão significativamente associados com os níveis de vit D. Identificou-se também nesse estudo outro polimorfismo como possível candidato a associação com os níveis de vit D, sendo esse o polimorfismo rs6013897 presente no gene da enzima *CYP24A1* (55). Mais tarde voltaram a ser desenvolvidos estudos que confirmaram a presença dos polimorfismos anteriormente referenciados. Jiang et al. (56) confirmou num estudo com 79 366 indivíduos de descendência europeia que o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 estava relacionado com os níveis de vitamina D. Cooper et al. (57) confirmou numa população britânica que o *CYP24A1*- rs6013897 estava associado aos níveis de vitamina D nos controlos utilizados no estudo. Zhang et al. (58) realizou o seu estudo em chineses Han e relatou a associação dos níveis de 25(OH)D ao polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793. Assim sendo, podemos concluir que a quantidade de vitamina D circulante é influenciada por determinadas variantes existentes nos genes das enzimas responsáveis pelo metabolismo da vitamina D.

### 1.3.3. A importância da vitamina D na saúde

A regulação da homeostase dos íons de cálcio e de fosfato, essenciais em múltiplos processos biológicos, é realizada pela ação conjunta da hormona vit D e da hormona paratiroide (PTH). O osso, o intestino e o rim são os principais locais de ação destas hormonas. Em condições de hipocalcemia, baixos níveis de cálcio no sangue, a vit D dá prioridade à manutenção dos níveis séricos de cálcio em detrimento da integridade óssea, induzindo a libertação de cálcio e fosfato a partir do osso. Ao nível do intestino, o calcitriol é responsável por estimular e regular a absorção do cálcio e do fósforo que provieram da alimentação. A síntese do calcitriol, no túbulo proximal do rim, é estimulada pela PTH. O túbulo proximal é o local onde decorre a reabsorção do ião fosfato, processo regulado indiretamente pela vit D. No túbulo distal, a vit D e a PTH são responsáveis pela reabsorção do cálcio. O calcitriol é um potente supressor génico da PTH, bem como a expressão de CYP27B7, levando à inibição da sua própria produção por feedback negativo. A produção do calcitriol também pode ser inibida pela hormona FGF-23 (fator de crescimento de fibroblastos 23) sintetizada pelos osteócitos e osteoblastos nos ossos longos. Esta hormona é sintetizada em resposta a um aumento dos níveis séricos de fosfato e calcitriol, levando ao aumento da excreção do fosfato pela urina e à inibição da expressão da CYP27B7 (34, 59-61).

A deficiência de vitamina D tem sido associada ao raquitismo em crianças e osteomalacia/osteoporose em adultos. A suplementação adequada de vit D poderá prevenir a osteoporose e reduzir o risco de fraturas ósseas, em 20% (62).

Nos últimos tempos, a vitamina D deixou de ser associada apenas ao seu papel tradicional de manutenção da homeostase do cálcio e passou também a ser associada a diversas doenças extra-esqueléticas como é o caso de doenças cardiovasculares, cancro, doenças infecciosas e doenças autoimunes. Essa mudança de perspetiva em relação ao papel biológico da vit D deveu-se à descoberta da presença do VDR em diversas células e tecidos extra-esqueléticos (63-66).

A associação da vitamina D às doenças cardiovasculares foi evidenciada especialmente em consequência da sua deficiência estar relacionada com doenças como a aterosclerose, cardiomiopatia, fibrose, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, doença arterial periférica e doença arterial coronária. Essa associação foi confirmada devido aos benefícios da suplementação com vit D, em que ocorre a atenuação da aterosclerose e da formação de placas e a reversão da cardiomiopatia em doentes hipocalcémicos tratados (65).

O calcitriol apresenta uma grande variedade de efeitos imunomoduladores nas células imunes, incluindo a sinalização na imunidade inata (atividade antimicrobiana e apresentação de antígenos) e na imunidade adaptativa (função dos linfócitos T e B). Para além disso, a vit D aumenta a atividade antimicrobiana em macrófagos pertinentes para a defesa contra doenças infecciosas. A estimulação da tolerância imunitária e a diminuição da resposta autoimune são as

principais ações desencadeadas pela vitamina D ao nível do sistema imunitário (66, 67). Várias doenças autoimunes, incluindo da tiroide, já foram associadas aos níveis de vitamina D (68). Unal et al. (68) demonstraram que tanto os doentes com tiroidite de Hashimoto e doença de Graves, as duas apresentações clínicas mais relevantes das doenças autoimunes da tiroide, tinham menores valores de calcidiol em comparação com os controlos.

Para além das patologias anteriormente referidas, a vitamina D tem sido bastante relacionada com o cancro. Nas últimas décadas, têm sido investigadas associações entre a vitamina D e 18 tipos de cancro diferentes, como da mama, da próstata, do cólon, entre outros (63, 69). Para além disso, os efeitos antitumorais da vitamina D foram sustentados por vários estudos em culturas de células e em animais. Esses efeitos podem ser reduzidos através de mecanismos que as células cancerígenas desenvolveram para diminuir os níveis de calcitriol (63, 70, 71). Vários dados remetem para a eventualidade da vitamina D poder regular todo o processo de tumorigénese, desde a sua iniciação até à metástase e interações célula-microambiente. Esta vitamina regula diversos comportamentos celulares, tais como proliferação, diferenciação, apoptose, autofagia, transição epitelial-mesenquimal, angiogénese, defesa antioxidante, inflamação e interações célula imune-célula cancerígena (63).

#### 1.3.4. Associação da vitamina D ao cancro da tiroide

A deficiência de vitamina D foi também associada ao desenvolvimento e progressão do cancro de tiroide. Diversos estudos em culturas celulares (*in vitro*) e em animais (*in vivo*) demonstraram os efeitos anti tumorais da vit D (63, 72, 73).

O VDR, responsável pela ação da vitamina D, é expresso tanto nas células epiteliais normais da tiroide como nas células cancerígenas da tiroide. Além disso, constatou-se que as expressões de VDR e de CYP27B1 estavam aumentadas no PTC quando comparadas com o tecido tiroideu normal (74). Constatou-se também que nas metástases ganglionares do PTC, a expressão do VDR foi reduzida em comparação com o tecido tireoideu normal e com o PTC primário, levantando a questão de que a via da vitamina D possa estar relacionada com a diferenciação e proliferação reduzida no PTC (74). A expressão aumentada da proteína VDR no PTC em comparação com o tecido não cancerígeno foi recentemente confirmada (75). Para além da expressão da proteína VDR estar elevada no PTC, a expressão de mRNA de VDR, TMPRSS4 (protease serina transmembranar tipo 4) e ECM1 (proteína de matriz extracelular-1) foram significativamente maiores em amostras de PTC em comparação com o tecido de tiroide normal dos mesmos doentes (76). A TMPRSS4 é uma proteína que está envolvida na invasão, metástases, migração, adesão e transição epitelial-mesenquimal em células cancerígenas, enquanto que a glicoproteína de ECM1 promove a formação de vasos sanguíneos, estimula a proliferação de células epiteliais malignas, leva à progressão tumoral e foi identificada em numerosos tumores epiteliais malignos. A expressão aumentada de VDR foi frequentemente

associada ao aumento da expressão de ECM1 e/ou TMPRSS4, no entanto os mecanismos envolvidos ainda não foram bem estudados (76). Além do mRNA estar elevado no PTC, a sua sobre-expressão foi descrita como correlacionada com piores prognósticos, como subtipos de PTC com pior prognóstico, metástases ganglionares, estágio avançado e recidiva (77).

Para além do aumento da expressão de VDR e de CYP27B1 no CT, também foi descoberta a expressão aumentada da enzima inativadora CYP24A1 em adenomas foliculares, PTC e FTC em comparação com o tecido tiroideu normal. No entanto, em PTC com metástases ganglionares a expressão do CYP24A1 foi diminuída em comparação com PTC não metastizado (72, 78). Yavropoulou et al. (79) também descreveu níveis aumentados de CYP24A1 em PTC, no entanto, ao contrário do que foi referido anteriormente, esse aumento foi mais evidente em amostras de PTC com características histológicas agressivas. O mesmo se confirmou em outros estudos como em Balla et al. (80) e Zou et al. (81). Zou et al. (81) sugerem que existe uma forte correlação entre a sobre-expressão de CYP24A1 e a mutação BRAF p.V600E. O nível bastante elevado de CYP24A1 está relacionado com a progressão da doença, com um pior prognóstico e com a presença de BRAF p.V600E. A expressão de CYP24A1, nas linhas celulares de cancro da tiroide que expressam BRAF p.V600E, foi significativamente superior quando comparada com as linhas celulares sem expressão de BRAF p.V600E. Por outro lado, o PLX4720 (inibidor de BRAF p.V600E) pode diminuir significativamente a expressão de CYP24A1 e assim aumentar os efeitos anti-proliferativos do calcitriol nas linhas celulares do cancro da tiroide (81). Mais tarde, os mesmos autores (82) realizaram um estudo semelhante, mas em animais, e observaram que o crescimento do cancro de tiroide foi significativamente reduzido na ausência da expressão de CYP24A1, observaram também que a expressão de CYP24A1 aumentou na presença da mutação BRAF p.V600E. Portanto, os autores demonstraram, *in vivo*, que a sobre-expressão de CYP24A1 coopera com a mutação BRAF p.V600E de forma a promover a progressão do cancro da tiroide, sendo que o potencial oncogénico é significativamente reduzido após a remoção do CYP24A1. A sobre-expressão de CYP24A1 poderá ser utilizada como um biomarcador para o prognóstico. Os autores sugerem que o CYP24A1 funciona como um oncogene no PTC, onde a sua super-expressão ativa múltiplas cascatas de sinalização de modo a promover a progressão maligna e resistência ao tratamento com PLX4720 (82).

Para além do estudo *in vivo* anteriormente mencionado (82), outros estudos foram realizados de forma a relacionar a vitamina D com o carcinoma da tiroide. Dackiw et al. (73) implantaram células derivadas de carcinoma folicular humano no pescoço de camundongos. Posteriormente, estes animais receberam uma injeção com calcitriol durante 21 dias. Nos animais tratados com vitamina D, após os 21 dias observou-se que o volume médio do tumor apresentou uma redução de 38 % ( $p < 0,003$ ). Os resultados destes autores sugeriram que a administração de calcitriol pode restaurar as reservas de p27 nas células do carcinoma da tiroide, reduzindo assim o tamanho do tumor e prevenindo o crescimento metastático (73). Liu et al. (83) também

realizaram um estudo semelhante ao anterior, demonstrando que o tratamento com calcitriol reduziu o peso do tumor em cerca de 50 %.

Os efeitos anti-proliferativos da vitamina D foram bem caracterizados em vários modelos de culturas de células e de animais com cancro, em que a vit D impediu o desenvolvimento e progressão do cancro. Contudo, os dados clínicos em humanos são bastante inconsistentes, existindo estudos que relacionam os níveis de vitamina D com o cancro da tiroide, enquanto que outros não observaram qualquer relação (84). Hu et al. (84) desenvolveram o seu estudo a partir de 276 chineses Han, em que 138 possuíam PTC e 138 eram controlos. Neste estudo, a concentração plasmática de 25(OH)D foi inversamente associada ao risco de PTC, isto é, indivíduos chineses Han com PTC tinham valores de 25(OH)D significativamente menores em comparação aos controlos saudáveis. Concluíram que os altos níveis circulantes de vit D podem estar associados a um risco diminuído de CT. Este estudo teve algumas limitações como o tamanho da amostra, o facto de a determinação da concentração plasmática de 25(OH)D ter sido avaliada apenas uma vez e não se ter realizado uma análise dos subtipos de CT. Zhang et al. (75) realizaram um estudo pré-operatório em 158 doentes, em que 80 tinham bócio nodular e 78 tinham PTC, que iriam ser submetidos a uma tireoidectomia. Concluíram que o nível sérico pré-operatório de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> no PTC era significativamente menor do que no bócio nodular, no entanto os níveis séricos do calcitriol em doentes com PTC não foi significativamente diferente em relação ao sexo, idade, tamanho do tumor, estágio TNM, estratificação de risco de recidiva ou metástases. Concluíram também que a 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> pode inibir a proliferação e induzir a apoptose em células PTC e poderia ser um novo e potencial marcador para identificar PTC e bócio nodular (75). Para além destes autores, Roskies et al. (85) também realizaram um estudo pré-operatório em que 212 doentes iriam ser submetidos à tireoidectomia. Os doentes estudados foram estratificados com base nos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub>, em que o limiar estabelecido foi de 37,5 nmol/L, e a deficiência de vitamina D foi descrita como sendo abaixo desse valor e a suficiência de vitamina D acima desse valor. Estes autores observaram que no grupo com deficiência de vitamina D 9 em 12 pacientes tiveram um diagnóstico maligno e no grupo com suficiência de vitamina D 33 pacientes em 88 possuíam um diagnóstico maligno. Portanto concluíram que existe uma maior taxa de malignidade no grupo com deficiência de vitamina D em comparação com o grupo com suficiência de vitamina D (75% vs 37,5%), correspondendo a um risco relativo de 2,0 (  $p = 0,03$ ; IC 95% 1,07-2,66), sugerindo que a vitamina D pode ser um fator de risco modificável para o cancro da tiroide (85). Kim et al. (86) estudaram um total de 548 doentes do género feminino que iriam ser submetidos à tireoidectomia total por PTC. Os doentes foram categorizados em quatro quartis de acordo com os níveis séricos pré-operatórios de calcidiol, sendo que as características clinico-patológicas do PTC também foram analisadas. Os níveis de calcidiol pré-operatórios foram significativamente menores em doentes com tumores maiores que 1 cm ( $p=0,041$ ) ou com metástases ganglionares ( $p=0,043$ ). Doentes com níveis mais baixos de calcidiol (<46,2 nmol/L-mediana) também tiveram um risco significativamente maior em estádios de cancro superiores, indicando portanto que os níveis de

calcidiol baixos podem estar associadas a características clínico-patológicas de pior prognóstico em doentes do género feminino com PTC (86). Sahin et al. (87) realizaram um estudo em 344 doentes com PTC e 116 controlos e demonstraram a presença de baixos níveis séricos de vitamina D (calcidiol <20 ng/mL) em 71 % dos doentes com PTC, mas apenas em 59% dos controlos. Portanto, os autores observaram a diminuição significativa dos níveis de vitamina D e uma maior frequência de deficiência de vitamina D em doentes com cancro de tiroide. Para além disso, os níveis de vitamina D também foram associados ao tamanho do tumor (87). Stepien et al. (88) revelaram níveis significativamente mais baixos de calcitriol em 27 doentes com PTC, 16 doentes com FTC e 7 doentes com ATC comparados com 26 controlos saudáveis, e também relataram uma relação inversa dos níveis de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D com um estágio de tumor avançado. Os autores concluíram que o nível de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D está associado negativamente com o PTC, o FTC e com o ATC e está correlacionado com o estadiamento clínico. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de 25(OH)D (88). Penna-Martinez et al. (89) mostraram níveis séricos mais baixos de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D em 172 doentes com DTC, em comparação com 321 controlos saudáveis. Verificaram ainda que os níveis de calcitriol eram insuficientes (<20 pmol/L) em 25,4 % e 33,3 % dos casos com PTC e FTC, respetivamente, e que apenas 1,8 % dos controlos saudáveis tinham baixos níveis de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. No entanto, não houve diferenças significativas para os níveis de 25(OH)D (89).

Além dos estudos acima mencionados, outros grupos de investigadores relataram dados contrastantes que sugerem que não há relação entre a 25(OH)D e o cancro da tiroide (90-93).

### 1.3.5. Estudos genéticos de associação entre a vitamina D e o cancro da tiroide

Para uma melhor compreensão da base genética de doenças poligénicas, como é o caso do cancro da tiroide, é importante o desenvolvimento de técnicas de análise genética. Neste sentido, os grandes estudos de associação genética (GWAS) têm contribuído de forma positiva, esclarecendo o mecanismo da doença, através da identificação de polimorfismos em genes que até então não se associavam com a doença em questão. Por norma, os polimorfismos identificados não são o motivo da doença, no entanto poderão identificar regiões genómicas onde possam existir variantes causais (54). Como já foi referido, os polimorfismos perto dos genes ou nos genes *FOXE1*, *RET* e *XRCC1* estão associados ao risco de cancro de tiroide, podendo influenciar a regulação génica (18). Até aos dias de hoje, existem poucos estudos de associação genética entre os genes da síntese, metabolismo, atividade e catabolismo da vitamina D (*DHCR7*, *CYP2R1*, *CYP27B1*, *VDR* e *CYP24A1*) e o risco de desenvolvimento de cancro da tiroide. Apenas foram realizados dois estudos acerca da associação dos polimorfismos no gene *VDR* e o risco de cancro de tiroide. Um deles concluiu que não havia nenhuma associação entre os genótipos de cada polimorfismo analisado no gene *VDR* e a suscetibilidade para o cancro da tiroide (94). O outro estudo revelou (89) a existência de uma associação entre o genótipo AA



do polimorfismo Apal (rs7975232) e o genótipo FF do polimorfismo FokI (rs10735810) no gene do *VDR* e o carcinoma folicular da tireoide. Os doentes com FTC tinham menos frequentemente os genótipos AA e FF em comparação com os controlos saudáveis. Portanto, estes genótipos poderão conferir uma proteção contra o FTC. Para além disso, nesta investigação não houve associação global significativa entre as variantes Apal, TaqI, BsmI e o FokI do *VDR* com o PTC (89). Mais tarde, Penna-Martinez et al. (95) realizaram um estudo em 253 doentes alemães com DTC e 302 controlos saudáveis, em que investigaram os polimorfismos rs12794714, rs10741657 no gene *CYP2R1*, rs10877012, rs4646536 no gene *CYP27B1* e rs927650, rs2248137, rs2296241 no gene *CYP24A1* e a sua associação com o cancro da tireoide. Os autores relataram uma associação positiva entre o polimorfismo rs2296241 do gene *CYP24A1* e o FTC, o que poderá indicar que a presença do genótipo GG no *CYP24A1*-rs2296241 contribui para o desenvolvimento do carcinoma diferenciado da tireoide. Os autores observaram também que o haplótipo rs2248137C /rs2296241A protege contra o PTC, enquanto que os haplótipos rs927650C/rs2296241G, rs2248137C/rs2296241G e rs927650C/rs2248137C/rs2296241G do *CYP24A1* foram mais frequentes no FTC, comparado com os controlos saudáveis (95).

Apesar dos SNP's *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP24A1*-rs6013897 terem sido associados aos níveis de vit D em estudos GWAS (55-58), até ao momento, não há estudos sobre a associação destes SNP's ao cancro da tireoide.

#### **1.4. Objetivo do estudo**

O objetivo deste estudo caso-controlo foi determinar o contributo dos SNP's *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP24A1*-rs6013897, para a suscetibilidade genética ao CT na população Portuguesa e a sua associação com os parâmetros clínicos da doença.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. População em estudo**

Realizou-se um estudo caso-controlo, retrospectivo, que incluiu doentes com carcinoma da tireoide e indivíduos saudáveis. Do primeiro grupo fizeram parte 500 doentes com carcinoma da tireoide, identificados pelo Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO-Coimbra), dos quais 409 eram do género feminino e 91 do género masculino, com média de idades  $\pm$  desvio padrão de  $46,1 \pm 13,9$  anos. Relativamente à população controlo, os participantes foram 500 dadores de sangue, recrutados em postos de colheita do Instituto Português de Sangue na Região Centro, dos quais 387 eram do género feminino e 113 do género masculino, com média de idades  $\pm$  desvio padrão de  $35,9 \pm 14,2$  anos.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CE-FCS-2013-017 e CE-FCS-2011-003). A recolha das amostras biológicas apenas se concretizou após assinado o consentimento informado por parte de todos os participantes.

### **2.2. Extração de ADN a partir de sangue humano**

A extração de ADN genómico foi efetuada a partir de leucócitos de sangue periférico através do método de salting-out, adaptado de Miller (96).

O sangue periférico (10 mL) foi colhido para tubos contendo o anticoagulante EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético), e enviado para o laboratório. No laboratório, a amostra de sangue foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL, perfazendo um volume final de 40 mL com o tampão de lise de glóbulos vermelhos (RBC: 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH 7.4). Seguidamente, o tubo foi agitado manualmente e incubado a  $4^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, durante os quais foi submetido a várias inversões. Após a incubação, o tubo foi centrifugado (Allegra<sup>TM</sup> X-22R, Beckman Coulter, Fullerton, Ca, EUA) a 2500 rpm (rotações por minuto) durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ , realizando-se de seguida uma decantação cautelosa do sobrenadante, preservando-se o sedimento de células onde se encontravam os leucócitos. Os passos anteriores foram repetidos até que o sedimento de células apresentasse uma cor branca. Com vista à lise de leucócitos, após ressuspender no vórtex (Velp Scientifica, Milan, Italy), ao sedimento de células adicionaram-se 5 mL de tampão de extração secundária (SE: 75 mM NaCl, 25 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH 8.0), 12.5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/ml) e 500  $\mu\text{L}$  de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 10%, colocando-se de seguida a incubar durante a noite (ou no mínimo 6 horas) a  $55^\circ\text{C}$  num bloco térmico (Star Lab, Chennai, Índia). Ao longo deste passo, o tampão SE inativou as nucleases (responsáveis pela degradação do ADN) e o detergente aniónico (SDS) em

cooperação com a proteinase K teve como função a destruição das membranas celulares e proteínas.

As proteínas desnaturadas tendem a ligar-se ao ADN, tornando-se fortes contaminantes, de maneira que é necessário um passo de precipitação das mesmas. Para tal, adicionaram-se ao tubo, presente no bloco térmico, 3 mL de NaCl (cloreto de sódio) saturado (6 M), regressando novamente para a incubação à temperatura de 55 °C durante 10 min. Em seguida, o tubo foi agitado no vórtex durante 25 segundos, aos quais se seguiu uma centrifugação a 4000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente.

Com vista à precipitação do ADN, decantou-se o sobrenadante para um novo tubo de centrífuga, adicionou-se aproximadamente 17 mL de etanol a 100% e inverteu-se o tubo cerca de 50 vezes, observando-se a formação do novelo de ADN. De seguida, o tubo foi colocado na centrífuga a 4500 rpm durante 5 min a 4 °C de forma a obter-se um sedimento de ADN, o qual foi lavado com 10 mL de etanol a 70% e centrifugado a 4500 rpm durante 5 min a 4 °C. De seguida, descartou-se o sobrenadante e transferiu-se, com a ajuda de uma ponta estéril, o sedimento de ADN para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e deixou-se secar à temperatura ambiente durante 30 min. Após esse período, reidratou-se o sedimento de ADN com 1 mL de tampão TE (Tris-EDTA:10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA), e deixou-se em agitação lenta e contínua (*Rotator Mixer, RM Multi-1, Starlab, Alemanha*) durante a noite à temperatura ambiente.

### 2.3. Quantificação de ADN

Na técnica anterior foi realizada a extração de ADN, contudo este poder-se-á encontrar em concentrações muito altas/baixas ou possuir impurezas, aspetos que condicionariam as metodologias posteriores. Posto isto, é de extrema relevância a análise quantitativa e qualitativa das amostras de ADN, tendo esta sido realizada através da medição da densidade ótica (DO) de cada amostra por espectrofotometria ultravioleta (Nanophotometer spectrophotometer B-80-3004-33, Implen GmbH, Munich, Germany). Neste equipamento, ocorre a absorção de raios ultravioleta (UV) pelos nucleótidos, sendo possível estimar a concentração de ácidos nucleicos numa amostra. De forma a obter o grau de pureza é definido um rácio DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub>. A absorção é efetuada somente pelo ADN se o rácio for entre 1.8-2.0. Um rácio superior a 2.0 indica a presença excessiva de ARN enquanto que um rácio inferior a 1.8 significa que as amostras estão contaminadas por proteínas ou outros absorventes de UV. Após a quantificação das amostras procedeu-se à diluição das mesmas, de modo a obter uma solução de uso com uma concentração final de 100 ng/μL e um volume final de 200 μL.

## 2.4. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Kary Mullis nos anos 80 desenvolveu um método muito útil nos dias de hoje, designando-se de reação de polimerização em cadeia, mais conhecido por PCR. (97) A reação em cadeia é catalisada por uma enzima polimerase termorresistente, que permite a amplificação exponencial, *in vitro*, de fragmentos específicos de ADN em diversas cópias.

Neste trabalho, realizou-se a amplificação de um fragmento dos genes *CYP24A1*, *CYP2R1* e *DHCR7/NADSYN1*, mais especificamente a região que contém os SNP's (polimorfismos) em estudo. Essas regiões foram delimitadas por oligonucleótidos (desenhados no programa Primer3Plus (98)) que emparelharam em cada cadeia de ADN, obtendo-se assim fragmentos com um comprimento específico (Tabela 1).

O sucesso desta técnica depende da otimização das condições de PCR, como o ajuste das temperaturas de annealing (temperatura de emparelhamento dos oligonucleótidos) e das concentrações de  $MgCl_2$  (cloreto de magnésio), sendo estas condições distintas para cada fragmento amplificado, como demonstra a Tabela 1. Após a otimização, todas as reações de PCR ocorreram num volume final de 15  $\mu L$ , contendo 1U de enzima Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase (Dream Taq Green DNA, ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), o respetivo tampão com  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs (Nzytech, Lisboa, Portugal), 0,25  $\mu M$  de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN genómico e por fim água destilada estéril de modo a perfazer o volume final. Em simultâneo, realizou-se um controlo negativo, para despiste de possíveis contaminações, que foi sujeito às mesmas condições das reações anteriores, mas sem ADN.

As reações de PCR ocorreram num termociclador (T100TM, Bio RAD, Hercules, CA, EUA), iniciando-se por uma desnaturação inicial com duração de 5 min a 95°C. De seguida, decorreram 34 ciclos de amplificação, em que cada ciclo englobou a desnaturação do ADN durante 30 seg a 95°C; a hibridação dos oligonucleótidos ao ADN a uma temperatura de annealing ótima, dependente da sequência dos oligonucleótidos (Tabela 1), durante 30 seg; e a polimerização das novas cadeias a 72°C durante 30 seg. Posteriormente aos 34 ciclos, sucedeu-se uma extensão final durante 10 min a 72°C. Por fim, para refrigeração dos produtos de PCR, o último passo consistiu num período de 2 minutos a 12°C.

Tabela 1. Oligonucleótidos e condições de PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes *DHCR7*, *CYP2R1* e *CYP24A1*.

Gene	Polimorfismo	Oligonucleótidos (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temperatura de annealing (°C)	Fragmento (pb)
<i>DHCR7</i>	rs12785878	F: CCCCTGCCTTAGTGTGTGTT R: CCGGGGGCCTTTAGTTAGAC	2,0	56	618
<i>CYP2R1</i>	rs2060793	F: TGGAGCTGAGATCAACTGCTAAA R: GTGACACATACCTGTGGGGG	1,5	58	768
<i>CYP24A1</i>	rs6013897	F: GGACTCCTGGTTGGGTGATG R: TCCTTGATCCAAATGTCCGCA	2,0	55	516

MgCl<sub>2</sub> (mM), concentração de cloreto de magnésio em mili molar; °C, graus centígrados; pb, pares de bases.

## 2.5. Digestão enzimática

Os polimorfismos em estudo criaram ou retiraram um local de corte para uma endonuclease de restrição específica possibilitando a identificação dos diversos genótipos dos participantes. Na técnica de digestão enzimática, os fragmentos anteriormente amplificados são digeridos por enzimas específicas, durante um período de tempo e a uma temperatura apropriada à atividade máxima de cada endonuclease. A enzima adequada a cada SNP foi escolhida através do programa Nebcutter 2.0 disponível na Internet (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). A digestão enzimática realizou-se de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante das enzimas (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA; Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

A análise do polimorfismo rs12785878 (T>G) perto do gene *DHCR7*, localizado no cromossoma 11 a 8 quilobases a montante do local de iniciação da transcrição do gene *DHCR7* foi efetuada através da enzima TaqI (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA). Após a amplificação do fragmento do *DHCR7*, adicionaram-se 10 µL de produto de PCR a uma mistura de 5 µL com 2,5 U de enzima TaqI, *Buffer* Tango 10x (1,5 µL) e água destilada estéril até perfazer o volume final. De seguida, a digestão ocorreu num termociclador a 65°C durante 2 horas.

A enzima Schl (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foi aplicada no estudo do polimorfismo rs2060793 (G>A) presente no cromossoma 11, numa zona *upstream* do gene *CYP2R1*. A endonuclease Schl necessitou de 3 horas de incubação a 37 °C, de forma a digerir os fragmentos de ADN. Foi necessário também inativar a enzima, expondo-a durante 20 min a uma temperatura de 65°C, no final da digestão. A mistura de 5 µL, realizada para a digestão da porção deste gene, possuía 2,5 U de Schl, *Buffer* Tango 10x (1,5 µL) e água. A esta mistura adicionou-se 10 µL de produto de PCR.

O polimorfismo rs6013897(T>A) localizado numa zona intergénica próxima do gene *CYP24A1* que se encontra no cromossoma 20, foi analisado pela enzima TscAI (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A mistura que possuía 2,5 U de TscAI, *Buffer* Tango 10x (2 µL), água até prefazer um volume final de aproximadamente 20 µL foi adicionada a 10 µL de produtos de PCR. De forma a que a enzima possuísse uma atividade máxima de funcionamento, a incubação decorreu durante 3 horas a 65 °C.

**Tabela 2-** Polimorfismos em estudo, endonucleases aplicadas, genótipos esperados e peso molecular dos respetivos fragmentos gerados por restrição enzimática.

Polimorfismo	Enzima de Restrição	Genótipo	Fragmentos gerados (pb)
rs12785878 (T>G)	TaqI	TT	618
		GG	320, 298
		TG	618, 320, 298
		GG	379, 248, 141
rs2060793 (G>A)	SclI	AA	627, 141
		GA	627, 379, 248, 141
		TT	222, 192, 102
		AA	414, 102
rs6013897 (T>A)	TscAI	TA	414, 222, 192, 102

pb, pares de bases.

## 2.6. Eletroforese

Os fragmentos de ADN produzidos tanto na PCR como na digestão enzimática foram separados e visualizados através da eletroforese em gel de agarose.

Na preparação do gel para observação dos produtos de PCR, dissolveu-se sob aquecimento agarose (GRS Agarose LE, Grisp) em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA 1X: 40mM Tris-trisaminometano; 20mM ácido acético; 1mM EDTA), obtendo-se uma concentração de 1%. Posteriormente, corou-se com GreenSafe (GreenSafe Premium, nzytech) (1 µL/mL). Após solidificação do gel, colocaram-se 5 µL de produto de PCR em cada poço. Além das amostras, colocou-se também um marcador de peso molecular (HyperLadder II, Bioline or VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis) para facilitar a confirmação do peso molecular dos fragmentos obtidos. Após digestão enzimática, foi necessário realizar um outro gel de agarose para visualização dos fragmentos obtidos e, deste modo, a identificação dos diferentes genótipos. Assim, colocaram-se 9 µL de produto digerido num gel de 2 a 3 %, dependendo do gene a ser analisado.

Como os fragmentos de ADN têm carga negativa, na presença de uma diferença de potencial de 180 mV, irão migrar para o polo positivo, por um período de tempo que variou consoante a amostra depositada nos poços. Para produtos de PCR a migração ocorreu durante 20 min, enquanto que para produtos resultantes de digestão enzimática, o tempo variou de 40 minutos a uma hora dependendo do tamanho de fragmentos que se pretendia distinguir. Por fim, o gel foi observado num transiluminador (UVITEC system Cambridge) acoplado a um sistema de aquisição de imagem, sob radiação UV.

Após aquisição de imagem para o gene *DHCR7*, realizado num gel de agarose a 2%, foi possível distinguirem-se três genótipos: o genótipo homozigótico GG que apresenta dois fragmentos (298 e 320pb); o genótipo homozigótico TT, que apenas exhibe o fragmento inicial (618pb), uma vez que a endonuclease TaqI não reconhece qualquer local de corte; e por fim o genótipo heterozigótico TG, que gera 3 fragmentos (298,320 e 618pb) (Tabela 2). Para o gene *CYP2R1* realizou-se um gel de agarose a 2% e observaram-se 3 genótipos distintos: o genótipo homozigótico GG, que apresenta 3 fragmentos (141, 248 e 379pb); o genótipo homozigótico AA, que gera 2 fragmentos (141 e 627pb); e o genótipo heterozigótico GA, que produz 4 fragmentos (141, 248,379 e 627pb) (Tabela 2). Relativamente ao gene *CYP24A1*, efetuou-se um gel de agarose a 3% e observaram-se 3 genótipos distintos: o genótipo homozigótico TT, que origina 3 fragmentos (102,192 e 222 pb); o genótipo homozigótico AA, que produz 2 fragmentos (102 e 414pb); e o genótipo heterozigótico TA, que gera 4 fragmentos (102, 192, 222 e 414pb) (Tabela 2).

## 2.7. Sequenciação de ADN

O método de genotipagem foi confirmado e validado por sequenciação de Sanger de nove amostras representativas dos três genótipos possíveis para cada polimorfismo. Frederick Sanger, nos anos 70, desenvolveu o método de terminação de cadeia didesoxi (99). De acordo com este método, a identificação exata de todos os nucleótidos de uma determinada sequência de ADN é conseguida devido à presença de ddNTPs (2', 3'-didesoxinucleotidos trifosfato). Os ddNTPs, ao contrário dos dNTPs, não possuem um grupo 3'-hidroxilo, portanto a enzima ADN polimerase deixa de ter a capacidade de adição de novos nucleótidos, o que consequentemente irá levar ao cessamento da nova cadeia de ADN assim que um ddNTP é incorporado. Desta forma, obtêm-se fragmentos que distam entre si em apenas um nucleótido. Após a obtenção das cadeias truncadas, estas são submetidas a uma eletroforese capilar para determinar a sequência de bases do ADN.

O processo acima descrito ocorreu num equipamento de sequenciação automática de ADN, este possui detetores de fluorescência que tornam possível a distinção dos quatro marcadores fluorescentes para timinas, adeninas, citosinas e guaninas.

Resumidamente, o primeiro passo desta metodologia consistiu na desnaturação das cadeias duplas de ADN, que geraram cadeias simples. Em seguida, deu-se início à reação de polimerização através da hibridação dos oligonucleótidos e reconhecimento destes pela ADN polimerase. Nesta reação, os ddNTPs, que se encontram em concentrações mais baixas do que os dNTPs, são incorporados aleatoriamente na cadeia provocando a interrupção da síntese de ADN. Como cada um dos quatro ddNTPs tem incluído um fluorocromo que emite a um comprimento de onda específico, torna-se possível a identificação de cada fragmento truncado após a sua migração no gel de eletroforese capilar. Desta forma, a sequência de ADN pode ser determinada pela ordem em que cada fragmento passa através do detetor de fluorescência.

Antes da desnaturação do ADN, foi necessário realizar um passo prévio, a purificação enzimática dos produtos de PCR através da ação das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO-SAP, Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA). Este passo foi realizado de forma a degradar as sequências de ADN em cadeia simples que pudessem interferir na correta leitura dos fragmentos sequenciados. Nesta etapa, adicionou-se a 10 µL de produto de PCR, 0,25 µL de EXO e 0,5 µL de SAP e incubou-se 20 min a 37 °C seguidos de 20 min a 80°C. Após a purificação, seguiu-se a reação de sequenciação de ADN, em que para cada amostra, foram realizadas duas reações (correspondentes a cada uma das direções da cadeia). Cada reação de 11 µL foi preparada com 2 µL de produto de PCR purificado, 0,25 µL de oligonucleótido e 1 a 4 µL de DTCS Quick Start *Master Mix* (GenomeLab, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA), dependendo do comprimento do fragmento em estudo. Os oligonucleótidos colocados na reação de sequenciação foram os mesmos da reação de PCR. A reação de sequenciação decorreu num termociclador com um período de desnaturação inicial de 6 min a 96°C, seguido de 30 ciclos compostos por 20 seg de desnaturação a 96 °C, 20 seg a 55°C para o emparelhamento dos oligonucleótidos e 40 seg de extensão a 60°C. De seguida, decorreu um período de 8 minutos para a extensão final a 60°C. No fim da reação de sequenciação, realizou-se a precipitação das amostras obtidas, adicionando a cada reação de sequenciação, 1,2 µL de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), 1,2 µL de EDTA (100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0), 0,6 µL de glicogénio (20 mg/mL) e 60 µL de etanol 95% a -20°C. Esta solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 30 min a 4°C. Seguidamente, de modo a lavar o sedimento resultante, adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% e centrifugou-se novamente a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C, sendo esta lavagem repetida novamente. No final da centrifugação, retirou-se o etanol e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente. De seguida, cada sedimento foi ressuspensionado em 10 µL de SLS (Sample Loading Solution) de forma a manter a cadeia de ADN desnaturada durante a sequenciação. Submeteu-se o produto obtido à eletroforese capilar num sequenciador automático de ADN (GenomeLab TM GeXP, Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). O método utilizado para sequenciar as amostras compreendeu uma temperatura capilar de 50 °C, uma temperatura de desnaturação de 90 °C durante 120 seg, uma voltagem de injeção de 2,0 kV durante 15 seg e uma voltagem de separação de 4,0 kV durante um determinado período de tempo variável dependendo do comprimento do fragmento.



As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de referência existentes no Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) usando o programa de análise *GenomeLab Genetic Analysis System software* (Version 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

## 2.8. Análise estatística

Foi efetuada uma análise estatística, com o intuito de averiguar a associação entre os três polimorfismos em estudo e a suscetibilidade genética para o desenvolvimento de CT. As frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo em doentes e controlos foram estabelecidas através de contagem direta.

Relativamente aos controlos e para cada polimorfismo, o desvio entre as frequências genotípicas (obtidas e esperadas) foi calculado com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Para avaliação do HWE procedeu-se ao cálculo das frequências genotípicas esperadas, e a sua comparação com as frequências observadas na população em análise, utilizando o teste do qui-quadrado *goodness-of-fit* [utilizando o programa *SNPstats* (<https://www.snpstats.net/snpstats/start.htm>) (100)].

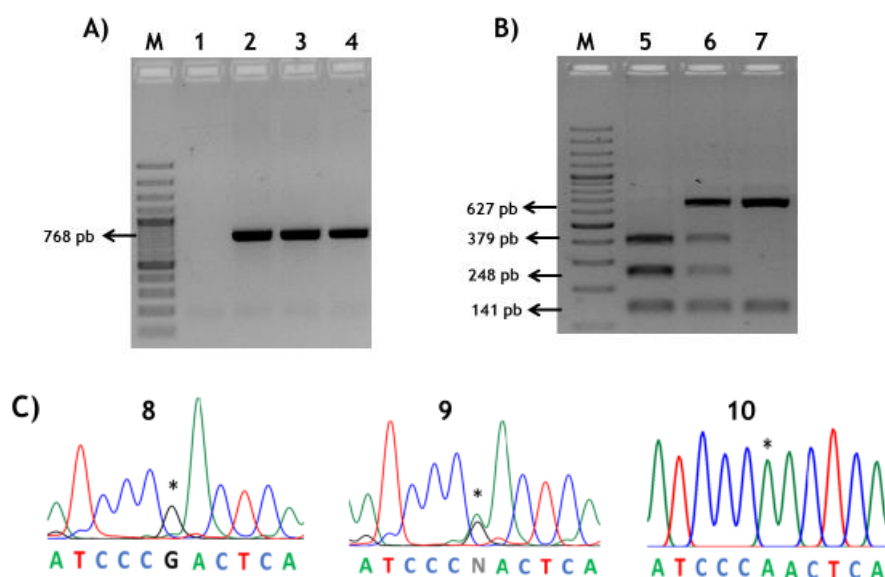
Como forma de proceder à comparação entre as frequências alélicas e genotípicas, entre o grupo de controlo e o grupo de doentes, realizou-se uma regressão logística, através do programa *SNPstats* (100). Foram obtidos os valores de odds ratio (OR), como forma de estimar o risco associado a cada alelo, com base num intervalo de confiança (IC) de 95% e os parâmetros foram ajustados com base na idade e no género. Através do critério de informação Akaike (AIC) (100), fornecido pelo *SNPstats*, foi estabelecido o melhor modelo hereditário para cada polimorfismo (codominante, dominante, recessivo, “overdominant” e aditivo), tendo-se considerado aquele que apresentou um menor valor de AIC. O mesmo método de análise estatística foi utilizado para a comparação dos subgrupos com os distintos parâmetros clínicos, nomeadamente, idade (inferior ou superior a 45 anos), género, subtipos PTC e FTC, tamanho do tumor (inferior ou superior a 1 cm) e presença ou ausência de metástases ganglionares ou à distância. O significado estatístico foi estabelecido para um valor de  $p < 0,05$ , sendo o mesmo corrigido para comparações múltiplas (três), utilizando o método de Bonferroni ( $3 \text{ SNP's } p \text{ corrigido} = 0,005/3 = 0,017$ ). Para além disso, realizou-se o cálculo do poder estatístico do estudo através do software *power and Sample Size Calculations* (versão 3.1.2) (101). A partir deste cálculo, assumiu-se uma frequência alélica menor entre 20% e 40% que estimou-se que a amostra do estudo era suficiente para detetar ORs entre 1,29 e 1,35, para o cancro de tiroide, sob o modelo hereditário aditivo, com um *power* de 0,80, com um erro tipo 1 de 0,05.

## 3. Resultados

### 3.1. Genotipagem

#### 3.1.1. Polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793

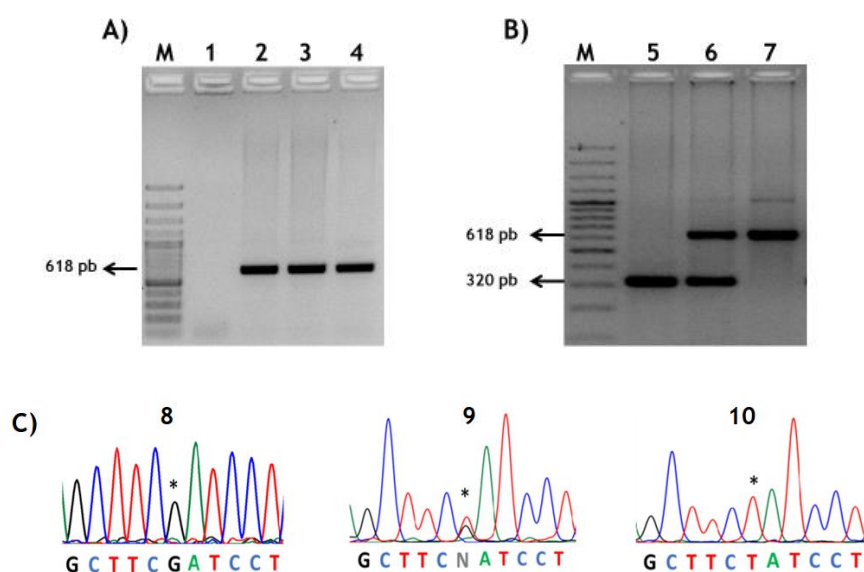
A região que abrange o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 (G>A) foi amplificada por PCR. De seguida os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1 % e posteriormente visualizou-se o fragmento amplificado de 768 pb (Figura 4A). Uma vez verificada a ausência de contaminação, as amostras seguiram foram submetidas à digestão enzimática. Esta técnica permitiu a genotipagem do polimorfismo, uma vez que pela ação da enzima *Schl*, foi possível distinguir os três genótipos. O genótipo homozigótico GG apresentou 3 fragmentos (141,248 e 379 pb), o genótipo homozigótico AA originou 2 fragmentos (141 e 627 pb) e o genótipo heterozigótico GA gerou 4 fragmentos (141,248,379 e 627 pb), como demonstra a Figura 4B. De forma a comprovar os resultados dos genótipos obtidos, realizou-se a sequenciação de ADN de uma amostra representativa de cada genótipo (Figura 4C).



**Figura 4. Genotipagem do polimorfismo *CYP2R1*- rs2060793 (G>A).** A) Eletroforese de produtos da reação de PCR contendo parte da região *upstream* do gene *CYP2R1* num gel de agarose a 1%; M- marcador de peso molecular; 1- poço que contém o controlo negativo; 2-4 banda representativa da amplificação do fragmento de interesse (768pb) onde o SNP em estudo está presente. B) Eletroforese dos produtos obtidos da digestão enzimática com a enzima *Schl* em gel de agarose a 2%; M- marcador de peso molecular; 5- genótipo homozigótico GG representado pela presença de 3 bandas no gel (141, 248, 379 pb); 6- genótipo heterozigótico GA caracterizado por 4 bandas (141, 248, 379 e 627 pb); 7- genótipo homozigótico AA que apenas exhibe 2 bandas no gel (141 e 627pb). C) Sequenciação de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793; 8- Genótipo homozigótico GG; 9- Genótipo heterozigótico GA; 10- Genótipo homozigótico AA. O asterisco assinala a posição do nucleótido polimórfico.

### 3.1.2. Polimorfismo *DHCR7*-rs12785878

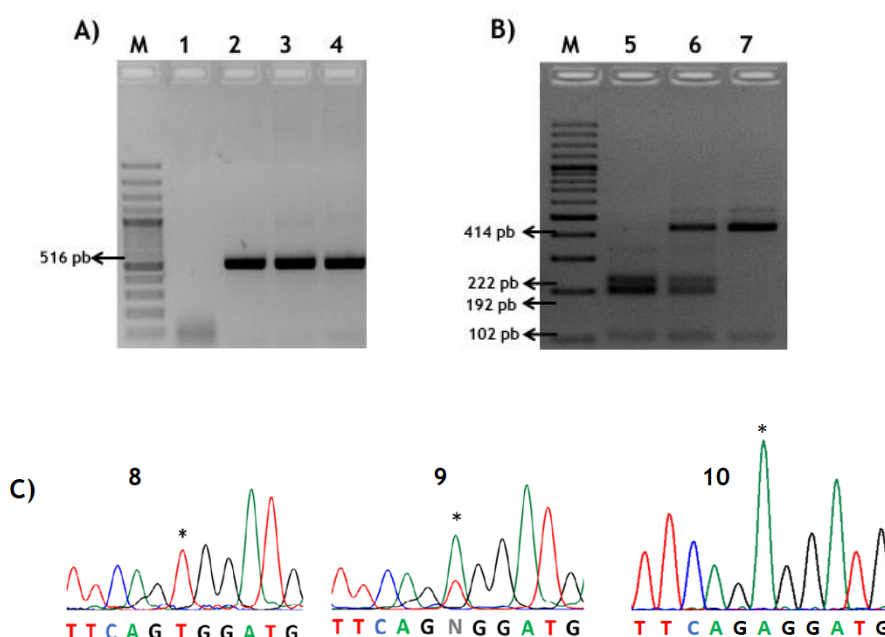
Os genótipos referentes ao polimorfismo rs12785878 (T>G) foram analisados após a amplificação da zona de interesse. Esta zona foi amplificada por PCR com a obtenção de um fragmento total de 618 pb, visualizado num gel de agarose após a eletroforese (Figura 5A). De seguida, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima Taq I, permitindo a distinção de três genótipos (Figura 5B). O genótipo homozigótico TT é representado por 1 fragmento (618pb), o genótipo homozigótico GG é representado por 2 fragmentos (298 e 320 pb) e o genótipo heterozigótico TA é representado por 3 fragmentos (298, 320 e 618). Os genótipos foram confirmados a partir da sequenciação de ADN de três amostras representativas (Figura 5C).



**Figura 5. Genotipagem do polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G).** A) Eletroforese de produtos de PCR em gel de agarose a 1%; M - marcador de peso molecular; 1- poço que contém o controlo negativo; 2-4- banda de 618pb representando o fragmento de interesse amplificado por reação de PCR. B) Eletroforese num gel de agarose a 2%, mostrando 3 genótipos possíveis para o SNP rs12785878 obtidos por digestão enzimática com TaqI; M - marcador de peso molecular; 5- genótipo homozigótico GG, caracterizado pela presença de uma banda no gel (320pb); 6- genótipo heterozigótico TG, representado por duas bandas (320 e 618 pb), 7- genótipo homozigótico TT, que origina uma banda no gel (618pb). C) Sequenciação de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878; 8- Genótipo homozigótico TT; 9- Genótipo heterozigótico TG; 10- Genótipo homozigótico GG. O asterisco assinala a posição do nucleótido polimórfico.

### 3.1.3. Polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897

A região que continha o polimorfismo rs6013897 (T>A) foi amplificada e os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose. Após a corrida, observou-se um fragmento de 516 pb como demonstra a Figura 6A. De seguida, realizou-se a técnica de digestão enzimática com a enzima *TscAI*, capaz de distinguir os 3 genótipos, representados na Figura 6B. O genótipo homozigótico TT foi identificado pela presença de três fragmentos (102,192,222 pb), o genótipo homozigótico AA pela presença de 2 fragmentos (414 e 102 pb) e o genótipo heterozigótico AG pela presença de 4 fragmentos (102,192,222 e 414 pb). O ADN de uma amostra representativa de cada genótipo foi sequenciado de modo a validar os resultados obtidos por digestão enzimática (Figura 6C).



**Figura 6. Genotipagem do polimorfismo *CYP24A1*- rs6013897 (T>A).** A) Eletroforese dos produtos da reação de PCR do fragmento intergênico de interesse em gel de agarose a 1%; M- marcador de peso molecular; 1- poço que contém o controlo negativo; 2-4: banda representativa do fragmento de interesse (516pb); B) Eletroforese num gel de agarose a 3% mostrando os 3 genótipos referentes ao SNP rs6013897, após digestão enzimática com a enzima *TscAI*; 5 - genótipo homozigótico TT representado no gel por 3 bandas (102, 192 e 222 pb); 6 - representa o genótipo heterozigótico TA pela presença de 4 bandas (102,192,222 e 414pb); 7- genótipo homozigótico AA onde observamos apenas 2 bandas no gel (102 e 414pb); C) Sequenciação de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897; 8- Genótipo homozigótico TT; 9- Genótipo heterozigótico TA; 10- Genótipo homozigótico AA. O asterisco assinala a posição do nucleótido polimórfico.

### 3.2. Análise estatística

De forma a testar a hipótese de a amostra em estudo ser representativa da população geral realizou-se o teste de equilíbrio de HWE, comparando as frequências genotípicas dos valores observados e esperados para os três polimorfismos, utilizando o programa SNPstats. Nenhum dos polimorfismos obteve valores de  $p$  significativos para o equilíbrio de HWE, indicando que as frequências genotípicas observadas na população controlo não se desviaram significativamente das frequências esperadas.

A comparação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações foi realizada pelo teste do qui-quadrado, onde os valores de  $p$  inferiores a 0,05 sugerem diferenças estatisticamente significativas. A partir da análise da Tabela 3, referente ao polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793, observa-se que não ocorreram diferenças entre o grupo dos doentes e o grupo dos controlos, nem para os parâmetros clínicos do tipo e tamanho do tumor. Contudo, para o parâmetro do desenvolvimento de metástases ganglionares ou à distância, verificou-se que houve diferenças estatisticamente significativas em relação às frequências genotípicas ( $p=0,022$ ) e alélicas ( $p=0,022$ ) entre os doentes que possuíam metástases e os que não as detinham, sendo que a presença do alelo A foi mais frequente no grupo dos que tinham metástases. No entanto, após o ajustamento do valor de  $p$  para comparações múltiplas, pelo teste de Bonferroni, este resultado deixou de ser significativo. Os resultados obtidos para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 exibiram diferenças significativas em relação às frequências genotípicas ( $p=0,0021$ ) e alélicas ( $p=0,0004$ ), em que a presença do alelo G foi mais frequente no grupo dos doentes (Tabela 4). Esta associação manteve-se significativa mesmo após o ajustamento do valor  $p$  para comparações múltiplas. Na Tabela 5 está representado o resultado para o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897, a partir da análise da mesma observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas comparando as frequências genotípicas e alélicas entre os doentes e os controlos. Também não se observaram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros clínicos estudados.

**Tabela 3.** Análise das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 de acordo com as características clínicas.

	Genótipos, n (%)			Alelos, n (%)	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Todos</b>					
Controlos (n=500)	183 (36,6)	256 (51,2)	61 (12,2)	622 (62,2)	378 (37,8)
Doentes (n=500)	189 (37,8)	236 (47,2)	75 (15,0)	614 (61,4)	386 (38,6)
OR (95% IC) §	1,00	0,89 (0,68-1,17)	1,19(0,80-1,77)		1,04 (0,86-1,25)
OR (95% IC) #	1,00	0,88 (0,66-1,16)	1,11 (0,74-1,68)		1,01 (0,83-1,22)
<b>Tipo de tumor</b>					
FTC (n=58)	23 (39,7)	23 (39,7)	12 (20,7)	69 (59,5)	47 (40,5)
PTC (n=442)	116 (37,6)	213 (48,2)	63 (14,2)	545 (61,7)	339 (38,3)
OR (95% IC) §	1,00	1,28 (0,70-2,37)	0,73 (0,34-1,55)		0,91 (0,62-1,91)
OR (95% IC) #	1,00	1,32 (0,71-2,46)	0,72 (0,33-1,54)		0,91 (0,61-1,36)
<b>Tamanho do tumor</b>					
>1 cm (n=362)	131 (36,2)	172 (47,5)	59 (16,3)	434 (59,9)	290 (40,1)
≤1 cm (n=138)	58 (42,0)	64 (46,4)	16 (11,6)	180 (65,2)	96 (34,8)
OR (95% IC) §	1,00	0,84 (0,55-1,28)	0,61 (0,33-1,15)		0,80 (0,60-1,07)
OR (95% IC) #	1,00	0,83 (0,54-1,27)	0,58 (0,31-1,10)		0,78 (0,58-1,05)
<b>Metástases ganglionares ou à distância</b>					
Não (n=385)	135 (35,1)	188 (48,8)	62 (16,1)	458 (59,5)	312 (40,5)
Sim (n=115)	54 (47,0)	48 (41,7)	13 (11,3)	156 (67,8)	74 (32,2)
OR (95% IC) §	1,00	0,64 (0,41-1,00)	0,52 (0,27-1,03)		0,70 (0,51-0,95)
			0,61 (0,40-0,93)		p=0,022 (b)
			p=0,022 (a)		
OR (95% IC) #	1,00	0,64 (0,41-1,01)	0,54 (0,27-1,07)		0,71 (0,51-0,97)
			0,62 (0,40-0,94)		p=0,028 (b)
			p=0,027 (a)		

n, número; OR, odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos e alelos como referência); IC, intervalo de confiança; FTC, carcinoma folicular da tiroide; PTC, carcinoma papilar da tiroide; §, valores não ajustados ao género e idade; #, valores ajustados ao género e idade; (a) modelo dominante; (b) modelo aditivo.

**Tabela 4.** Análise das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *DHCR7-12785878* de acordo com as características clínicas.

	Genótipos, n (%)			Alelos, n (%)	
	TT	TG	GG	T	G
<b>Todos</b>					
Controlos (n=500)	197 (39,4)	234 (46,8)	69 (13,8)	628 (62,8)	372 (37,2)
Doentes (n=500)	150 (30,0)	251 (50,2)	99 (19,8)	551 (55,1)	449 (44,9)
OR (95% IC) §	1,00	1,41 (1,07-1,86)	1,88 (1,30-2,74)		1,38 (1,15-1,65)
		p=0,0021 (a)	p=0,0021 (a)		p=0,0004 (b)
OR (95% IC) #	1,00	1,35 (1,01-1,81)	1,84 (1,25-2,72)		1,36 (1,13-1,64)
		p=0,0058 (a)	p=0,0058 (a)		p=0,0013 (b)
<b>Tipo de tumor</b>					
FTC (n=58)	14 (24,1)	31 (53,5)	13 (22,4)	59 (50,9)	57 (49,1)
PTC (n=442)	136 (30,8)	220 (49,8)	86 (19,5)	492 (55,7)	392 (44,3)
OR (95% IC) §	1,00	0,73 (0,38-1,42)	0,68 (0,31-1,52)		0,82 (0,56-1,22)
OR (95% IC) #	1,00	0,76 (0,39-1,49)	0,71 (0,32-1,60)		0,84 (0,57-1,25)
<b>Tamanho do tumor</b>					
>1 cm (n=362)	110 (30,4)	174 (48,1)	78 (21,6)	394 (54,4)	330 (45,6)
≤1 cm (n=138)	40 (29,0)	77 (55,8)	21 (15,2)	157 (56,9)	119 (43,1)
OR (95% IC) §	1,00	1,22 (0,78-1,91)	0,74 (0,41-1,35)		0,90 (0,68-1,20)
OR (95% IC) #	1,00	1,21 (0,77-1,91)	0,73 (0,39-1,33)		0,89 (0,67-1,19)
<b>Metástases ganglionares ou à distância</b>					
Não (n=385)	113 (29,4)	198 (51,4)	74 (19,2)	424 (55,1)	346 (44,9)
Sim (n=115)	37 (22,2)	53 (46,1)	25 (21,7)	127 (55,2)	103 (44,8)
OR (95% IC) §	1,00	0,82 (0,51-1,32)	1,03 (0,57-1,85)		0,99 (0,74-1,34)
OR (95% IC) #	1,00	0,83 (0,51-1,34)	1,06 (0,59-1,91)		1,01 (0,75-1,36)

n, número; OR, odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos e alelos como referência); IC, intervalo de confiança; FTC, carcinoma folicular da tiroide; PTC, carcinoma papilar da tiroide; §, valores não ajustados ao género e idade; #, valores ajustados ao género e idade; (a) modelo codominante; (b) modelo aditivo.

**Tabela 5.** Análise das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *CYP24A*-rs6013897 de acordo com as características clínicas.

	Genótipos, n (%)			Alelos, n (%)	
	TT	TA	AA	T	A
<b>Todos</b>					
Controles (n=500)	310 (62,1)	171 (34,3)	18 (3,6)	791 (79,3)	207 (20,7)
Doentes (n=500)	302 (60,4)	170 (34,0)	28 (5,6)	774 (77,4)	226 (22,6)
OR (95% IC) §	1,00	1,02 (0,78-1,33)	1,06 (0,87-2,95)		1,12 (0,90-1,38)
OR (95% IC) #	1,00	1,03 (0,78-1,35)	1,66 (0,88-3,14)		1,13 (0,91-1,41)
<b>Tipo de tumor</b>					
FTC (n=58)	34 (58,6)	19 (32,8)	5 (8,6)	87 (75,0)	29 (25,0)
PTC (n=442)	268 (60,6)	151 (34,2)	23 (5,2)	687 (77,7)	197 (22,3)
OR (95% IC) §	1,00	1,01 (0,56-1,83)	0,58 (0,21-1,64)		0,86 (0,55-1,35)
OR (95% IC) #	1,00	1,04 (0,57-1,89)	0,56 (0,20-1,57)		0,86 (0,55-1,36)
<b>Tamanho do tumor</b>					
>1 cm (n=362)	214 (59,1)	130 (35,9)	18 (5,0)	558 (77,1)	166 (22,9)
≤1 cm (n=138)	88 (63,8)	40 (29,0)	10 (7,2)	216 (78,3)	60 (21,7)
OR (95% IC) §	1,00	0,75 (0,49-1,15)	1,35 (0,60-3,04)		0,94 (0,67-1,30)
OR (95% IC) #	1,00	0,75 (0,49-1,17)	1,39 (0,61-3,15)		0,95 (0,68-1,32)
<b>Metástases ganglionares ou à distância</b>					
Não (n=385)	231 (60,0)	130 (33,8)	24 (6,2)	592 (76,9)	178 (23,1)
Sim (n=115)	71 (61,7)	40 (34,8)	4 (3,5)	182 (79,1)	48 (20,9)
OR (95% IC) §	1,00	1,00 (0,64-1,56)	0,54 (0,18-1,62)		0,88 (0,62-1,26)
OR (95% IC) #	1,00	0,99 (0,64-1,55)	0,52 (0,18-1,57)		0,87 (0,61-1,24)

n, número; OR, odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos e alelos como referência); IC, intervalo de confiança; FTC, carcinoma folicular da tireoide; PTC, carcinoma papilar da tireoide; §, valores não ajustados ao gênero e idade; #, valores ajustados ao gênero e idade.



## 4. Discussão e Conclusão

Neste estudo caso-controlo, foram estudados três polimorfismos existentes na proximidade ou nos genes responsáveis pela codificação de três enzimas fundamentais para a síntese (*DHCR7*-rs12785878), hidroxilação (*CYP2R1*-rs2060793) e catabolismo (*CYP24A1*-rs6013897) da vitamina D. As variantes genéticas descritas nestes genes influenciam os níveis séricos de vitamina D (54), razão pela qual foram selecionados para este estudo. Existem várias investigações que relacionaram os níveis de vitamina D com o carcinoma da tireoide. No entanto, os estudos que relacionam polimorfismos nos genes da via metabólica da vit D e o cancro da tireoide estão pouco explorados, existindo apenas alguns estudos sobre o efeito dos polimorfismos do gene *VDR* e do gene *CYP24A1* (89, 95). No presente estudo, a escolha dos polimorfismos foi realizada com base na análise de estudos de associação genética (55-58), em que estes polimorfismos foram associados aos níveis séricos de vitamina D. Apesar de os polimorfismos analisados neste trabalho nunca terem sido associados ao cancro da tireoide, os mesmos já foram associados a outras doenças, incluindo outros tipos de cancro (102-104). O *CYP24A1*-rs6013897 foi associado de forma significativa ao cancro da mama, em que indivíduos com o genótipo homozigótico AA (associado a menores níveis de vit D) apresentaram um aumento do risco em 86% de vir a desenvolver cancro da mama quando comparados aos indivíduos com o genótipo homozigótico TT (102). Existem também estudos que observaram uma sobre-expressão do *CYP24A1* em cancros, incluindo em células tiroideias cancerígenas (80-82).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a forma como os diversos genótipos e alelos influenciam a prevalência do CT na população portuguesa. Para a concretização desta análise foram considerados dois grupos principais, o grupo de doentes com CT e o grupo controlo. O grupo de doentes foi constituído por 500 doentes com CT. Importante referir que neste grupo foram analisados vários parâmetros clínicos com o intuito de apurar a existência de relações entre os três polimorfismos e a patogénese da doença. Por sua vez, o grupo controlo apresentou 500 indivíduos saudáveis. Com base na realização do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), foi possível constatar que as frequências genotípicas na população estudada não apresentavam desvios significativos que, caso acontecesse, poderia indiciar um enviesamento no processo de recrutamento da população de controlo ou um erro da técnica de genotipagem (105-107).

Posteriormente ao recrutamento dos doentes e controlos, os três polimorfismos foram analisados. Estes são polimorfismos de nucleótido único (SNP - single nucleotide polymorphism), ou seja, resultantes da troca de apenas um nucleótido por outro, numa determinada sequência genómica. Os três SNP's localizam-se em regiões não codificantes dos genes das respetivas enzimas, sendo que a sua existência não afeta a estrutura ou a sequência da enzima. No entanto, a presença destes polimorfismos em zonas não codificantes poderá desencadear alterações ao nível da expressão do gene, afetando a quantidade de enzima disponível. Para

além disso, as variantes identificadas poderão não ser as variantes causais, mas estar em desequilíbrio de ligação com variantes em regiões próximas, com efeito mais direto sobre a expressão ou função da enzima (108). Como já foi referido, as alterações nos genes que codificam as enzimas *DHCR7*, *CYP2R1* e *CYP24A1* podem afetar os níveis de vit D que, por sua vez, se relacionam com a suscetibilidade genética para o CT.

No caso do SNP *DHCR7*-rs12785878 (T>G), este mostrou uma associação estatisticamente significativa com a suscetibilidade genética para o CT. O alelo G foi significativamente ( $p=0,0004$ ) mais frequente no grupo de doentes, assim como o genótipo GG ( $p=0,0021$ ). Conclui-se a partir da análise realizada que o genótipo GG, sob o modelo codominante, concede aos seus portadores um risco de aproximadamente 1,9 vezes maior (OR 1,88; 95% IC 1,30-2,74) de vir a desenvolver o CT, enquanto que o genótipo TG confere um risco intermédio (OR 1,41; 95% IC 1,07-1,86  $p=0,0021$ ). O ajuste do valor  $p$  para o género e idade manteve as diferenças significativas encontradas, tal como quando aplicada a correção para comparações múltiplas (correção de Bonferroni). A influência deste SNP no risco de contrair o CT pode ter origem nas modificações da taxa de transcrição do gene *DHCR7*. Por sua vez, estas poderão desencadear alterações ao nível da via de metabolismo da vit D, levando a uma menor quantidade de vit D circulante, e incrementando assim o risco para o CT. Os nossos resultados vão de encontro aos obtidos em alguns estudos de associação genética em que o alelo G deste SNP foi associado a menores níveis de vit D (55, 56, 109-111), reforçando a hipótese de que a variante em causa influencia a suscetibilidade genética para o CT. Contudo, um estudo com indivíduos Árabes e sul Asiáticos não identificou tal associação (112). Os estudos são contraditórios, devido possivelmente a exposições ambientais e perfis genéticos diferentes entre populações geograficamente distintas (113).

No que diz respeito à variante *CYP2R1*-rs2060793 (G>A), foi identificada a sua associação com os níveis de vit D em diferentes populações (55, 58, 114). No entanto, num estudo com Chineses o mesmo não se verificou (109). No nosso estudo, com a população portuguesa, a variante *CYP2R1*-rs2060793 (G>A) não se encontrou associada ao cancro da tiroide.

Relativamente à variante *CYP24A1*-rs6013897 (T>A) foram desenvolvidos alguns trabalhos que associam esta variante aos níveis de vitamina D (55, 57). No entanto, o nosso estudo não encontrou quaisquer diferenças nos níveis de vit D entre os doentes e os controlos. Estudos com populações Chinesa e Finlandesa também não encontram diferenças nos níveis de vit D nos doentes e nos controlos (110, 111). No nosso estudo não se verificou nenhuma associação da variante *CYP24A1*-rs6013897 (T>A) com o cancro da tiroide.

Até ao momento, não existem estudos funcionais que relacionem os polimorfismos *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP24A1*-rs6013897 com a expressão das enzimas, pelo que permanece por esclarecer qual o mecanismo através do qual estes SNPs influenciam os níveis séricos de vit D.

Posteriormente à comparação entre os doentes e controlos, foi avaliada a relação entre parâmetros clínicos do CT (idade do diagnóstico, género, subtipos PTC e FTC, tamanho do tumor, presença de metástases ganglionares ou à distância) e os genótipos/alelos dos SNP's em estudo, de forma a compreender se estas variantes influenciam algum parâmetro clínico.

A incidência do cancro da tiroide aumenta com a idade, sendo significativamente mais agressivo em idosos. Para além disso, esta patologia é mais frequente no género feminino (18). Desta forma, os resultados foram também analisados em função do género e idade. Os resultados do estudo não sofreram alterações após a realização do ajustamento para género e idade. O ajuste à idade foi efetuado através de uma divisão de idades, com menos de 45 anos e com mais de 45 anos. Esta divisão etária foi realizada uma vez que o limite de 45 anos tem sido usado para o estadiamento clínico dos tumores (115).

Os carcinomas diferenciados da tiroide são os mais frequentes, sendo responsáveis por 90% de todos os casos de cancro de tiroide (14). O PTC e o FTC são os dois subtipos mais frequentes de DTC, em que o PTC representa 80-85% de todas as neoplasias da tiroide (20). O PTC apresenta um bom prognóstico, no entanto, este piora quando ocorrem metástases, que ocorrem sobretudo através dos vasos linfáticos e gânglios locais (9, 20). O FTC representa 10-15% de todas as neoplasias da tiroide. O FTC tem tendência a metastizar a longas distâncias ao contrário do PTC, podendo produzir metástases pulmonares ou ósseas após a disseminação hematogénica (9, 19). Alguns estudos mostraram uma associação entre os níveis de vitamina D e os tipos de carcinoma de tiroide, sendo o PTC o mais estudado (75, 84). Para além disso, outras investigações mostraram uma associação entre polimorfismos no gene *CYP24A1*, mais especificamente o rs229624, e o FTC (95). No entanto o nosso estudo não encontrou nenhuma associação entre os polimorfismos em estudo e os tipos de cancro da tiroide.

Para além dos tipos de carcinoma, também foi avaliado o tamanho do tumor (inferior a 1 cm e superior a 1 cm) de forma a avaliar a possível existência de uma associação destes polimorfismos em estudo com este parâmetro. Kim et al. (86) verificaram que os níveis de calcidiol estavam mais baixos em doentes com tumores superiores a 1 cm ( $p=0,041$ ). No entanto, o nosso estudo não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os polimorfismos em estudo e o tamanho do tumor.

As metástases ganglionares ou à distância foram também um dos parâmetros clínicos avaliados neste estudo. Este parâmetro clínico tem sido associado a uma menor esperança média de vida em doentes com carcinoma de tiroide diferenciado que possuam idade igual ou superior a 45 anos, sendo este um parâmetro importante a ser estudado (116). Alguns autores associaram os níveis de calcidiol baixos com o desenvolvimento de metástases ganglionares ( $p=0,043$ ) (86). Relativamente ao nosso estudo, o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 mostrou uma associação estatisticamente significativa com o desenvolvimento de metástases. O genótipo AA, sob o modelo hereditário autossómico dominante, foi significativamente ( $p=0,022$ ) mais frequente no

grupo de doentes que não desenvolveu metástases ganglionares ou à distância em comparação com o grupo de doentes que as desenvolveu. A partir da análise realizada concluímos que a presença do alelo A, que também é significativamente ( $p=0,022$ ) mais frequente nos doentes que não desenvolveram metástases, parece ter um efeito protetor (OR 0,70; 95% IC 0,51-0,95) contra o desenvolvimento de metástases. Quando estes valores são ajustados ao género e à idade as diferenças encontradas mantêm-se. Tal facto poderá indicar uma associação entre a variante *CYP2R1*-rs2060793 e a capacidade invasiva do tumor. No entanto, quando é aplicado a correção para comparações múltiplas, as diferenças deixam de ser estatisticamente significativas. Relativamente ao parâmetro clínico das metástases, nenhuma diferença foi encontrada em relação aos restantes dois polimorfismos.

Como limitação do nosso estudo podemos referir o facto de não possuímos os valores séricos de vitamina D dos indivíduos em estudo, dados esses que poderiam ajudar a esclarecer a associação da vit D ao CT. No entanto, o doseamento sistemático da vit D não é habitualmente realizado na altura do diagnóstico destes doentes por não constituir um parâmetro relevante do ponto de vista clínico. Por outro lado, a determinação dos valores atuais de vit D nos doentes, já operados e em seguimento clínico, não seria útil, uma vez que não refletiriam os valores de vit D na altura do desenvolvimento da doença. Para além disto, é essencial referir que os estudos de associação entre os níveis séricos de vitamina D e patologias da tiroide possuem uma limitação que é colocada por alguns investigadores (117, 118) nomeadamente que os baixos níveis de vitamina D podem não ser a causa, mas sim uma consequência da doença. Estes poderão justificar-se por uma menor exposição solar dos doentes ou uma menor digestão ou má absorção de alimentos ricos em vitamina D, devido às próprias doenças. Os estudos com polimorfismos são vantajosos visto que o património genético não varia ao longo dos anos, nem com o estado de saúde. Finalmente, as associações encontradas neste estudo podem ser específicas da população e não replicadas em outras populações com diferentes exposições ambientais e perfis genéticos.

Por fim, podemos concluir que o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G) está significativamente associado ao CT na população portuguesa. Para além disso o nosso estudo sugere que o alelo A do polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 poderá conferir um efeito protetor contra o desenvolvimento de metástases ganglionares ou à distância. Posto isto, o nosso estudo reforça a existência de um papel importante de polimorfismos presentes nos genes da via de metabolismo da vit D, sobre a suscetibilidade ao CT. As nossas descobertas podem também contribuir para uma melhor compreensão da patogénese do CT e do papel da vit D no desenvolvimento do processo tumorigénico associado.

## 5. Bibliografia

1. Stathatos N. Thyroid physiology. *Medical Clinics*. 2012;96(2):165-73.
2. Okpokam A, Johnson SJ. Pathology of the pituitary, parathyroid, thyroid and adrenal glands. *Surgery*. 2014;32(10):513-24.
3. Santisteban P, Bernal J. Thyroid development and effect on the nervous system. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2005;6(3):217-28.
4. Muro-Cacho CA, Ku NNK. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features-part 1. *Cancer Control*. 2000;7(3):276-87.
5. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123-40.
6. Ely KA, Bischoff LA, Weiss VL. Wnt Signaling in Thyroid Homeostasis and Carcinogenesis. *Genes*. 2018;9(4):204.
7. Damiano F, Rochira A, Gnani A, Siculella L. Action of Thyroid Hormones, T3 and T2, on Hepatic Fatty Acids: Differences in Metabolic Effects and Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):744.
8. Kolpak E, Kabrits S, Bubalo V. The follicle function and thyroid gland cancer. *Biology and Medicine*. 2015;7(1):1-6.
9. Baldini E, Sorrenti S, Tartaglia F, Catania A, Palmieri A, Pironi D, et al. New perspectives in the diagnosis of thyroid follicular lesions. *International Journal of Surgery*. 2017;41:S7-S12.
10. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The diagnosis and management of thyroid nodules: a review. *JAMA*. 2018;319(9):914-24.
11. Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *International Journal of Cancer*. 2015;136(9):2187-95.
12. Liu Y, Su L, Xiao H. Review of Factors Related to the Thyroid Cancer Epidemic. *International Journal of Endocrinology*. 2017;9.
13. Makazlieva T, Vaskova O, Majstorov V. Etiopathogenesis of Differentiated Thyroid Carcinomas. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2016;4(3):517.
14. Cabanillas ME, Dadu R, Hu MI, Lu C, Gunn GB, Grubbs EG, et al. Thyroid gland malignancies. *Hematology/Oncology Clinics*. 2015;29(6):1123-43.
15. Pacini F. Which patient with thyroid cancer deserves systemic therapy and when? *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;31(3):291-4.
16. Keane E, Francis E, Catháin ÉÓ, Rowley H. The role of race in thyroid cancer: systematic review. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2017;131(6):480-6.
17. Figge JJ. Epidemiology of thyroid cancer. *Thyroid Cancer*: Springer; 2016. p. 9-15.
18. Rebaï M, Rebaï A. Molecular genetics of thyroid cancer. *Genetics Research*. 2016;98.
19. Schmidbauer B, Menhart K, Hellwig D, Grosse J. Differentiated Thyroid Cancer—Treatment: State of the Art. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6):1292.
20. Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *Journal of Endocrinology*. 2017;235(2):R43-R61.
21. Zitzelsberger H, Bauer V, Thomas G, Unger K. Molecular rearrangements in papillary thyroid carcinomas. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5-6):301-8.
22. Carling T, Udelsman R. Thyroid cancer. *Annual review of medicine*. 2014;65:125-37.
23. Yi D, Song P, Huang T, Tang X, Sang J. A meta-analysis on the effect of operation modes on the recurrence of papillary thyroid microcarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(4):7148.
24. Mathur A, Olson MT, Zeiger MA. Follicular lesions of the thyroid. *Surgical Clinics*. 2014;94(3):499-513.
25. Cha YJ, Koo JS. Next-generation sequencing in thyroid cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):322.
26. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simões M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *European Journal of Endocrinology*. 2016;174(4):R117-R26.
27. Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(5):1612-7.

28. Acquaviva G, Visani M, Repaci A, Rhoden KJ, Biase D, Pession A, et al. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*. 2018;72(1):6-31.
29. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010;323(1):35-54.
30. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Schiavi F, Leskelä S, et al. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS genetics*. 2009;5(9):e1000637.
31. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, Sidhu S, et al. Association of FOXE1 polyalanine repeat region with papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(9):E1814-E9.
32. Brown LY, Brown SA. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *TRENDS in Genetics*. 2004;20(1):51-8.
33. Fard-Esfahani P, Fard-Esfahani A, Fayaz S, Ghanbarzadeh B, Saidi P, Mohabati R, et al. Association of Arg194Trp, Arg280His and Arg399Gln polymorphisms in X-ray repair cross-complementing group 1 gene and risk of differentiated thyroid carcinoma in Iran. *Iranian Biomedical Journal*. 2011;15(3):73.
34. Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):815-43.
35. Keane KN, Cruzat VF, Calton EK, Hart PH, Soares MJ, Newsholme P, et al. Molecular actions of vitamin D in reproductive cell biology. *Reproduction*. 2017;153(1):R29-R42.
36. Pilz S, Trummer C, Pandis M, Schwetz V, Aberer F, Gruebler M, et al. Vitamin D: current guidelines and future outlook. *Anticancer Research*. 2018;38(2):1145-51.
37. Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH, Christakos S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Research*. 2016;4:16041.
38. Goltzman D. Functions of vitamin D in bone. *Histochemistry and cell biology*. 2018:1-8.
39. Bikle DD, Malmstroem S, Schwartz J. Current Controversies: Are Free Vitamin Metabolite Levels a More Accurate Assessment of Vitamin D Status than Total Levels? *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):901-18.
40. Dereje S, Muradov I, Nazzal S, Nguyen T. Cholecalciferol (D3) Versus Ergocalciferol (D2) in Older Adults. *The Consultant Pharmacist®*. 2017;32(6):337-9.
41. Van Schoor N, Lips P. Global Overview of Vitamin D Status. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):845-70.
42. Smith LM, Gallagher JC. Dietary Vitamin D Intake for the Elderly Population: Update on the Recommended Dietary Allowance for Vitamin D. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):871-84.
43. Barrea L, Savastano S, Di Somma C, Savanelli MC, Nappi F, Albanese L, et al. Low serum vitamin D-status, air pollution and obesity: A dangerous liaison. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2017;18(2):207-14.
44. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *The Journal of Clinical Investigation*. 1985;76(4):1536-8.
45. Bouillon R. Genetic and Racial Differences in the Vitamin D Endocrine System. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):1119-35.
46. Razzaque MS. Sunlight exposure: do health benefits outweigh harm? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;175:44-8.
47. Carlberg C, Haq A. The concept of the personal vitamin D response index. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;175:12-7.
48. Thacher TD, Levine MA. CYP2R1 mutations causing vitamin D-deficiency rickets. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;173:333-6.
49. Thacher TD, Fischer PR, Singh RJ, Roizen J, Levine MA. CYP2R1 mutations impair generation of 25-hydroxyvitamin D and cause an atypical form of vitamin D deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(7):E1005-E13.
50. Nowaczyk MJ, Irons MB. Smith-Lemli-Opitz syndrome: phenotype, natural history, and epidemiology. *American Journal of Medical Genetics* 2012;160(4):250-62.
51. DeBarber AE, Eroglu Y, Merkens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011;13.
52. Carpenter TO. Cyp24a1 loss of function: Clinical phenotype of monoallelic and biallelic mutations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;173:337-40.

53. Cools M, Goemaere S, Baetens D, Raes A, Desloovere A, Kaufman J, et al. Calcium and bone homeostasis in heterozygous carriers of CYP24A1 mutations: a cross-sectional study. *Bone*. 2015;81:89-96.
54. Bahrami A, Sadeghnia HR, Tabatabaeizadeh SA, Bahrami-Taghanaki H, Behboodi N, Esmaili H, et al. Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(5):4033-43.
55. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, Van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet*. 2010;376(9736):180-8.
56. Jiang X, O'Reilly PF, Aschard H, Hsu Y-H, Richards JB, Dupuis J, et al. Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nature Communications*. 2018;9(1):260.
57. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(5):1624-31.
58. Zhang Z, He JW, Fu WZ, Zhang CQ, Zhang ZL. An analysis of the association between the vitamin D pathway and serum 25-hydroxyvitamin D levels in a healthy Chinese population. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;28(8):1784-92.
59. Navarro-García JA, Fernández-Velasco M, Delgado C, Delgado JF, Kuro-o M, Ruilope LM, et al. PTH, vitamin D, and the FGF-23-klotho axis and heart: going beyond the confines of nephrology. *European Journal of Clinical Investigation*. 2018;48(4):e12902.
60. Anderson PH. Vitamin D activity and metabolism in bone. *Current Osteoporosis Reports*. 2017;15(5):443-9.
61. Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;453:36-45.
62. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*. 2015;96(1):365-408.
63. Jeon S-M, Shin E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018;50(4):20.
64. Muscogiuri G, Tirabassi G, Bizzaro G, Orio F, Paschou S, Vryonidou A, et al. Vitamin D and thyroid disease: to D or not to D? *European Journal of Clinical Nutrition*. 2015;69(3):291.
65. Rai V, Agrawal DK. Role of Vitamin D in Cardiovascular Diseases. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):1039-59.
66. Vanherwegen A-S, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2017;46(4):1061-94.
67. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *Journal of Autoimmunity*. 2017;85:78-97.
68. Unal AD, Tarcin O, Parildar H, Cigerli O, Eroglu H, Demirag NG. Vitamin D deficiency is related to thyroid antibodies in autoimmune thyroiditis. *Central-European Journal of Immunology*. 2014;39(4):493.
69. Grant WB, Mohr SB. Ecological studies of ultraviolet B, vitamin D and cancer since 2000. *Annals of Epidemiology*. 2009;19(7):446-54.
70. Giammanco M, Di Majo D, La Guardia M, Aiello S, Crescimannno M, Flandina C, et al. Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(10):1399-434.
71. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochemical Journal*. 2012;441(1):61-76.
72. Clinckspoor I, Verlinden L, Mathieu C, Bouillon R, Verstuyf A, Decallonne B. Vitamin D in thyroid tumorigenesis and development. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2013;48(2):65-98.
73. Dackiw AP, Ezzat S, Huang P, Liu W, Asa SL. Vitamin D3 administration induces nuclear p27 accumulation, restores differentiation, and reduces tumor burden in a mouse model of metastatic follicular thyroid cancer. *Endocrinology*. 2004;145(12):5840-6.
74. Khadzokou K, Buchwald P, Westin G, Dralle H, Åkerström G, Hellman P. 25-Hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2006;54(3):355-61.
75. Zhang T, Zhang H, He L, Wang Z, Dong W, Sun W, et al. Potential Use of 1-25-dihydroxyvitamin D in the Diagnosis and Treatment of Papillary Thyroid Cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:1614.

76. Izkhakov E, Somjen D, Sharon O, Knoll E, Aizic A, Fliss DM, et al. Vitamin D receptor expression is linked to potential markers of human thyroid papillary carcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;159:26-30.
77. Choi JY, Yi JW, Lee JH, Song R-Y, Yu H, Kwon H, et al. VDR mRNA overexpression is associated with worse prognostic factors in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Connections*. 2017;6(3):172-8.
78. Clinckspoor I, Hauben E, Verlinden L, Van den Bruel A, Vanwalleghem L, Vander Poorten V, et al. Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012;60(7):502-11.
79. Yavropoulou M, Panagiotou G, Topouridou K, Karayannopoulou G, Koletsis T, Zampoulas T, et al. Vitamin D receptor and progesterone receptor protein and gene expression in papillary thyroid carcinomas: associations with histological features. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017;40(12):1327-35.
80. Balla B, Tóbiás B, Kosa J, Podani J, Horváth P, Nagy Z, et al. Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2015;38(3):313-21.
81. Zou M, BinHumaid FS, Alzahrani AS, Baitei EY, Al-Mohanna FA, Meyer BF, et al. Increased CYP24A1 expression is associated with BRAFV600E mutation and advanced stages in papillary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2014;81(1):109-16.
82. Zou M, Baitei EY, BinEssa HA, Al-Mohanna FA, Parhar RS, St-Arnaud R, et al. Cyp24a1 attenuation limits progression of BrafV600E-induced papillary thyroid cancer cells and sensitizes them to BRAFV600E inhibitor PLX4720. *Cancer research*. 2017;77(8):2161-72.
83. Liu W, Asa SL, Ezzat S. 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3 targets PTEN-dependent fibronectin expression to restore thyroid cancer cell adhesiveness. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(9):2349-57.
84. Hu M-J, Zhang Q, Liang L, Wang S-Y, Zheng X-C, Zhou M-M, et al. Association between vitamin D deficiency and risk of thyroid cancer: a case-control study and a meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2018;1-12.
85. Roskies M, Dolev Y, Caglar D, Hier MP, Mlynarek A, Majdan A, et al. Vitamin D deficiency as a potentially modifiable risk factor for thyroid cancer. *Journal of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*. 2012;41(3).
86. Kim JR, Kim BH, Kim SM, Oh MY, Kim WJ, Jeon YK, et al. Low serum 25 hydroxyvitamin D is associated with poor clinicopathologic characteristics in female patients with papillary thyroid cancer. *Thyroid*. 2014;24(11):1618-24.
87. Şahin M, Uçan B, Giniş Z, Topaloğlu O, Güngüneş A, Bozkurt NÇ, et al. Vitamin D3 levels and insulin resistance in papillary thyroid cancer patients. *Medical Oncology*. 2013;30(2):589.
88. Stepien T, Krupinski R, Sopinski J, Kuzdak K, Komorowski J, Lawnicka H, et al. Decreased 1-25 dihydroxyvitamin D3 concentration in peripheral blood serum of patients with thyroid cancer. *Archives of Medical Research*. 2010;41(3):190-4.
89. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann M-L, Selinski I, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2009;19(6):623-8.
90. Jonklaas J, Danielsen M, Wang H. A pilot study of serum selenium, vitamin D, and thyrotropin concentrations in patients with thyroid cancer. *Thyroid*. 2013;23(9):1079-86.
91. Danilovic DLS, Ferraz-de-Souza B, Fabri AW, Santana NO, Kulcsar MA, Cernea CR, et al. 25-Hydroxyvitamin D and TSH as risk factors or prognostic markers in thyroid carcinoma. *PloS one*. 2016;11(10):e0164550.
92. Kim D. Low vitamin D status is not associated with thyroid cancer risk. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2016;6(4):116-22.
93. Choi YM, Kim WG, Kim TY, Bae SJ, Kim H-K, Jang EK, et al. Serum vitamin D3 levels are not associated with thyroid cancer prevalence in euthyroid subjects without autoimmune thyroid disease. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2017;32(1):102.
94. Haghpanah V, Ghaffari SH, Rahimpour P, Abbasi A, Saeedi M, Pak H, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with thyroid cancer. *Gene Ther Mol Biol B*. 2007;11:299-304.
95. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Kahles H, Hinsch N, Hansmann M-L, et al. Impaired vitamin D activation and association with CYP24A1 haplotypes in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2012;22(7):709-16.
96. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.



97. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, editors. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 1986: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
98. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen J. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 2007;35:W71-W4.
99. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-7.
100. Sole X, Guino, E., Valls, J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.
101. Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Controlled Clinical Trials*. 1998;19:589-601.
102. Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, Joakimsen RM, Mathiesen EB, Njølstad I, et al. Polymorphisms related to the serum 25-hydroxyvitamin D level and risk of myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromsø Study. *PloS one*. 2012;7(5):e37295.
103. Alloza I, Otaegui D, De Lapuente AL, Antigüedad A, Varade J, Nunez C, et al. ANKRD55 and DHCR7 are novel multiple sclerosis risk loci. *Genes and Immunity*. 2012;13(3):253.
104. Haldar D, Agrawal N, Patel S, Kambale PR, Arora K, Sharma A, et al. Association of VDBP and CYP2R1 gene polymorphisms with vitamin D status in women with polycystic ovarian syndrome: a north Indian study. *European Journal of Nutrition*. 2016;1-9.
105. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet*. 2003;361(9357):598-604.
106. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *European Journal of Human Genetics*. 2004;12(5):395.
107. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;76(5):887-93.
108. Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(R1):R102-R10.
109. Zhang Y, Wang X, Liu Y, Qu H, Qu S, Wang W, et al. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13636.
110. Cheung C-L, Lau K-S, Sham P-C, Tan KC, Kung AW. Genetic variant in vitamin D binding protein is associated with serum 25-hydroxyvitamin D and vitamin D insufficiency in southern Chinese. *Journal of Human Genetics*. 2013;58(11):749.
111. Voipio AJ, Pakkala KA, Viikari JS, Mikkilä V, Magnussen CG, Hutri-Kähönen N, et al. Determinants of serum 25 (OH) D concentration in young and middle-aged adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Annals of Medicine*. 2015;47(3):253-62.
112. Elukum N, Alkayal F, Noronha F, Ali MM, Melhem M, Al-Arouj M, et al. Vitamin D insufficiency in Arabs and South Asians positively associates with polymorphisms in GC and CYP2R1 genes. *PLOS one*. 2014;9(11):e113102.
113. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genetics in Medicine*. 2002;4(2):45.
114. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(13):2739-45.
115. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging manual* 7ed. Springer. 2010.
116. Verburg FA, Mäder U, Tanase K, Thies E-D, Diessl S, Buck AK, et al. Life expectancy is reduced in differentiated thyroid cancer patients  $\geq$  45 years old with extensive local tumor invasion, lateral lymph node, or distant metastases at diagnosis and normal in all other DTC patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(1):172-80.
117. Mazokopakis EE, Papadomanolaki MG, Tsekouras KC, Evangelopoulos AD, Kotsiris D, Tzortzinis AA. Is vitamin D related to pathogenesis and treatment of Hashimoto's thyroiditis. *Hell J Nucl Med*. 2015;18(3):222-7.
118. Bizzaro G, Shoenfeld Y. Vitamin D and thyroid autoimmune diseases: the known and the obscure. *Immunologic Research*. 2015;61(1-2):107-9.